

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN MEDICINA



**Efecto de la administración
intranasal del compuesto EOF2
sobre la migración, proliferación y
diferenciación de precursores
neurales en lesiones mecánicas de
la corteza cerebral de ratón adulto**

ALUMNO: María del Carmen Marmolejo Sánchez

TUTORAS: Dra. Carmen Castro González y Dra. Noelia
Geribaldi Doldán

FACULTAD DE MEDICINA
2018-2019

La Dra. Carmen Castro González y la Dra. Noelia Geribaldi Doldán,

INFORMAN: Que el presente trabajo de investigación titulado “Efecto de la administración intranasal del compuesto EOF2 sobre la migración, proliferación y diferenciación de precursores neurales en lesiones mecánicas de la corteza cerebral de ratón adulto”, constituye el Trabajo de Fin de Grado que presenta D^a. María del Carmen Marmolejo Sánchez, alumna de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz en el Área de Fisiología, bajo su dirección y, una vez revisado, no encuentran objeciones para que sea presentado para su lectura y defensa.

Y para que conste, expido y firmo el presente informe en Cádiz, marzo de 2019.

Carmen Castro González

Noelia Geribaldi Doldán

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESÚMEN	3
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Neurogénesis.....	7
3.2 NSC y diferenciación celular	7
3.3 NSC somáticas	8
3.4 Neurogénesis embrionaria en ratones.....	9
3.5 Neurogénesis en el cerebro adulto: reposición neuronal en condiciones fisiológicas	10
3.6 Neurogénesis en la SVZ	11
3.7 Neurogénesis en el DG	12
3.8 Nicho neurogénico	13
3.9 Neurogénesis en el cerebro adulto: reposición neuronal en condiciones patológicas	14
3.10 Proliferación glial tras un daño traumático en el SNC de un ratón adulto	15
3.11 Proteínas Quinasas de tipo C (PKC) y Neurogénesis	16
3.12 Moléculas activadoras de PKC.....	20
3.13 PKC y diferenciación	21
3.14 Barrera hemato-encefálica (BHE).....	21
3.15 Vía de administración intranasal.....	24
3.16 PKC, latiranos, neurogénesis y regeneración de lesiones cerebrales	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Diseño del estudio.....	28
6.2 Diseño experimental	28
6.3 Animales de experimentación.....	29
6.4 Aspectos éticos.....	29
6.5 Lesión en la corteza cerebral.....	30
6.6 Procedimiento de administración y marcaje con BrdU ⁺	31
6.7 Preparación del tejido	31

6.8 Inmunohistoquímica	31
6.9 Grupos experimentales	33
6.10 Análisis de los resultados	33
6.11 Variables.....	34
6.12 Análisis de datos.....	34
6.13 Dificultades y limitaciones del estudio.....	35
7. RESULTADOS	36
7.1 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la migración de las células progenitoras neurales hacia la zona lesionada	36
7.2 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la generación de neuroblastos en la región lesionada	36
7.3 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la generación de NSC sin afectar el tamaño de la cicatriz glial.....	37
7.4 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la migración de las células progenitoras neurales desde la SVZ a la lesión	39
7.5 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la generación de neuroblastos en la SVZ	40
7.6 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la diferenciación de los NPC hacia la estirpe glial en la SVZ	40
7.7 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la proliferación de los NPC en el DG.....	42
7.8 La administración intranasal del compuesto EOF2 reduce la presencia de neuroblastos en el DG.....	42
7.9 La administración intranasal del compuesto EOF2 disminuye las células gliales en el DG.....	43
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES	49
10. BIBLIOGRAFÍA.....	49

1. ABREVIATURAS

aPKC	Proteínas quinasas C atípicas
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BrdU	Bromodesoxiuridina
BMP	Proteínas morfogénicas del hueso
BHE	Barrera hemato-encefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
CDK	Quinasas dependientes de ciclina
ChAT	Acetiltransferasa
cPKC	Proteínas quinasas C clásicas o convencionales
DAG	Diacilglicerol
DAt	Dopaminérgicas
DCX	Doblecortina
DG	Giro dentado del hipocampo
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
E8	Día embrionario 8
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Ins-1,4,5-P3	Inositol trifosfato
MAPK/Erk	Vía de las Ras/Raf/proteína quinasa activada por mitógenos
NG2	Precusores de oligodendrocitos
nIPC	Células progenitoras neurales intermedias
NPC	Precusores neurales
nPKC	Proteínas quinasas C nóveles
NSC	Células madre neurales
OB	Bulbo olfatorio
OSN	Neuronas sensitivas del nervio olfatorio
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PFA	Paraformaldehído

PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKC	Proteínas quinasas
PLCγ	Fosfolipasa Cy
PMA	13-O-acetil-12-O-miristilforbol
RGC	Células radiales gliales
RMG	Ruta migratoria rostral
RTK	Receptores tirosina-quinasas
SCZ	Zona subcallosa
SGZ	Zona subgranular
SNC	Sistema nervioso central
SVZ	Zona subventricular
TGF-α	Factor de crecimiento transformante-alfa
VL	Ventrículos laterales
VZ	Zona ventricular
5HT	Serotoninérgicas

2. RESÚMEN

Fundamento y objetivo

La muerte neuronal originada por lesiones de cualquier etiología como accidentes cerebrovasculares isquémicos, traumatismos o enfermedades neurodegenerativas, entre otras, es un proceso irreversible para el que no se dispone actualmente de un tratamiento eficaz. El descubrimiento de células madre neurales (NSC) en el cerebro adulto ha hecho posible la búsqueda de opciones terapéuticas basadas en la reposición neuronal. En condiciones fisiológicas existen dos zonas cerebrales con capacidad neurogénica: la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado del hipocampo (DG). Sin embargo, en condiciones patológicas, la reposición neuronal es muy escasa, debido a que la respuesta inflamatoria que se genera en la lesión facilita la secreción de moléculas señalizadoras que actuando a través de vías de señalización intracelular impiden neurogénesis. En este trabajo se estudia el efecto de la administración intranasal del compuesto EOF2 o simplemente vehículo (control) sobre la proliferación y diferenciación celular tras una lesión en la corteza motora primaria de ratones adultos.

Metodología

Se trata de un estudio experimental donde se analiza el proceso de proliferación (células marcadas con Bromodesoxiuridina (BrdU*)) y diferenciación (hacia la estirpe neuronal o glial) de los precursores neurales (NPC) en la zona lesionada, en la SVZ y DG, después de una lesión mecánica en la corteza motora de ratones adultos, tras la administración intranasal de EOF2 o únicamente vehículo.

Resultados y conclusiones

Observamos que la administración intranasal del compuesto EOF2 induce la migración de los precursores hacia la zona de la lesión desde las zonas fisiológicamente neurogénicas como lo es la SVZ. Además, las células encontradas en la zona de la lesión correspondían a fenotipos neuronales y gliales. En el caso de la SVZ observamos que existen menos células proliferantes en el hemisferio correspondiente a la lesión (ipsilateral) sugiriendo que esta disminución se debe a que son esas células que migran en dirección a la lesión. Además, el tratamiento con EOF2 incrementa el número de células proliferantes

que migran a la lesión en el lado ipsilateral en comparación con los animales tratados únicamente con vehículo. Estas células corresponden al fenotipo neuronal (Doblecortina (DCX⁺)). En el caso del DG del hipocampo observamos que, si bien no existen diferencias en las células proliferantes, se observa una disminución de los neuroblastos y de las células marcadas con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en los animales tratados con EOF2 comparados con los tratados con vehículo.

El compuesto EOF2 fomenta la migración de los NPC en un intento de reparar las zonas lesionadas.

Palabras clave

Neurogénesis, nicho neurogénico, células madre neurales, progenitores neurales, migración, latiranos, EOF2.

ABSTRACT

Basis and objective

Neuronal death caused by lesions of any etiology such as ischemic strokes, traumatismos or neurodegenerative diseases, among others, is an irreversible process for which effective treatment is not currently available. The discovery of neural stem cells (NSCs) in the adult brain has made possible the search for therapeutic options based on neuronal replacement. Under physiological conditions there are two cerebral areas with neurogenic capacity: the subventricular zone (SVZ) and the dentate gyrus of the hippocampus (DG). However, in pathological conditions, neuronal replacement is very scarce, because the inflammatory response generated in the lesion facilitates the secretion of signaling molecules that act through intracellular signaling pathways to prevent neurogenesis. In this work the effect of the intranasal administration of the EOF2 compound or simply vehicle (control) on cell proliferation and differentiation after an injury in the primary motor cortex of adult mice is studied.

Methodology

This is an experimental study which analyzes the proliferation process (cells marked with Bromodeoxyuridine (BrdU⁺)) and differentiation (towards the neuronal or glial stock) of the neural precursors (NPC) in the injured area, SVZ and the DG, after a mechanical lesion in the motor cortex of adult mice, after intranasal administration of EOF2 or only vehicle.

Results and conclusions

We observed that the intranasal administration of the compound EOF2 induces the migration of the precursors to the injured area from the physiologically neurogenic areas such as the SVZ. In addition, the cells found in the area of the lesion corresponded to neuronal and glial phenotypes. In the case of the SVZ, we observed that there are fewer proliferating cells in the hemisphere corresponding to the lesion (ipsilateral), suggesting that this decrease is due to the fact that these cells migrate in the direction of the lesion. In addition, treatment with EOF2 increases the number of proliferating cells migrating to the lesion on the ipsilateral side as compared to animals treated with only vehicle. These cells correspond to the neuronal phenotype (Doublecortin (DCX⁺)). In the case of the DG we

observed that, although there are no differences in the proliferating cells, a decrease of the neuroblasts and of the cells marked with glial fibrillary acidic protein (GFAP) is observed in the animals treated with EOF2 compared with those treated with vehicle.

The compound EOF2 encourages the migration of NPCs in an attempt to repair injured areas.

Key words

Neurogenesis, neurogenic niche, neural stem cells, neural progenitors, migration, lathirans, EOF2.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Neurogénesis

Se denomina neurogénesis al proceso de formación de nuevas neuronas funcionales a partir de células madre neurales (NSC) y progenitores neurales. Hasta hace poco tiempo se creía que este proceso solo ocurría durante el desarrollo embrionario para la formación del sistema nervioso central (SNC) y periodo perinatal en mamíferos. Desde hace unas décadas sabemos que la neurogénesis permanece activa en zonas específicas del cerebro durante la vida adulta [1]. En los años 60, Joseph Altman dio las primeras evidencias sobre la presencia de nuevas neuronas en algunas regiones del cerebro adulto. Más tarde, en los años 80, Fernando Nottebohn y colaboradores llevaron a cabo estudios en aves, con los que demostraron la incorporación de nuevas neuronas en el SNC [2]. Pero no fue hasta los años 90, cuando Altman demostró la existencia de neurogénesis, con evidencias anatómicas de generación de nuevas células en algunas áreas del cerebro postnatal y adulto de la rata [3]. Posteriormente se consiguió obtener NSC multipotentes de cerebro de mamífero adulto a partir de las cuales se han generado neuronas y astrocitos *in vitro* [4, 5]. Simultáneamente se descubrió, en otros mamíferos adultos, la presencia de neurogénesis a lo largo de toda la vida, inclusive en el ser humano [6].

3.2 NSC y diferenciación celular

Las células madre son células multipotentes, no especializadas, las cuales poseen las capacidades de auto renovarse y diferenciarse en células especializadas en respuesta a diferentes señales. Las células madre pueden dividirse por dos mecanismos: división simétrica o división asimétrica. En la división simétrica cuando la célula madre prolifera da lugar a dos células hijas idénticas a ella, por lo que mediante este mecanismo se consigue aumentar la población de células madre. Mientras que, en la división asimétrica, cuando ésta prolifera da lugar a una célula hija idéntica a la original y otra con un potencial de división menos limitado, consiguiéndose la generación de progenitores, los cuales poseen un potencial de diferenciación hacia un linaje celular definido, sin que se afecte el número

de células madre, ya que se mantiene la capacidad de auto renovarse en cada división asimétrica [7].

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual células no especializadas sufren modificaciones y adquieren funciones específicas, posibilitando la generación de tejidos complejos y/u órganos. Este procedimiento está regulado por vías de señalización celular y sustentado mediante mecanismos epigenéticos de regulación, como la activación o el silenciamiento de genes específicos que determinan el destino celular [8, 9].

La propiedad que habilita a las células madre para crear células distintas a ellas mismas recibe el nombre de potencialidad, y depende del estadio de desarrollo del organismo y del tejido donde se ubiquen estas células. De este modo, en el cuerpo humano distinguimos más de 400 tipos de células distintas, todas originadas de un cigoto, que es una célula madre totipotencial. A partir del cigoto se crea una masa celular pluripotencial, a partir de la cual se puede dar lugar a cualquier tipo celular que se encuentre en las tres capas germinales primarias del embrión y son conocidas como células madre embrionarias. Las células madre de cada una de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, son multipotentes, y a partir de éstas se originarán células cada vez más diferenciadas y especializadas que formarán los diferentes tejidos [10].

Las células madre específicas de tejido, que reciben el nombre de células madre de adulto o somáticas, son células multipotenciales, que permanecen tras el desarrollo embrionario en tejidos diferenciados u órganos y pueden dar origen a muchos o todos de los tipos celulares de ese tejido u órgano. Las mejor determinadas son las células madre hematopoyéticas que dan lugar a todos los linajes celulares de la sangre [11], y las NSC [12].

3.3 NSC somáticas

Las NSC somáticas son células multipotentes, las cuales cuando se activan y llevan a cabo divisiones asimétricas dan lugar a progenitores neurales. Estos progenitores neurales son células de fenotipo indiferenciado con gran capacidad de auto replicación, que a su vez pueden dar origen a precursores con una capacidad proliferativa limitada, aunque comprometidos con alguna de las estirpes neurales. De este modo diferenciamos: precursores neuronales (neuroblastos) y precursores gliales (glioblastos). Los neuroblastos

darán origen a las neuronas y los glioblastos darán origen a las células gliales, es decir a los astrocitos y a los oligodendrocitos.

Dichos precursores poseen una capacidad proliferativa limitada, es decir, son unipotenciales, perdiendo su capacidad de auto replicación a medida que se dividen y diferenciándose a células maduras [13, 14] (Figura 1).

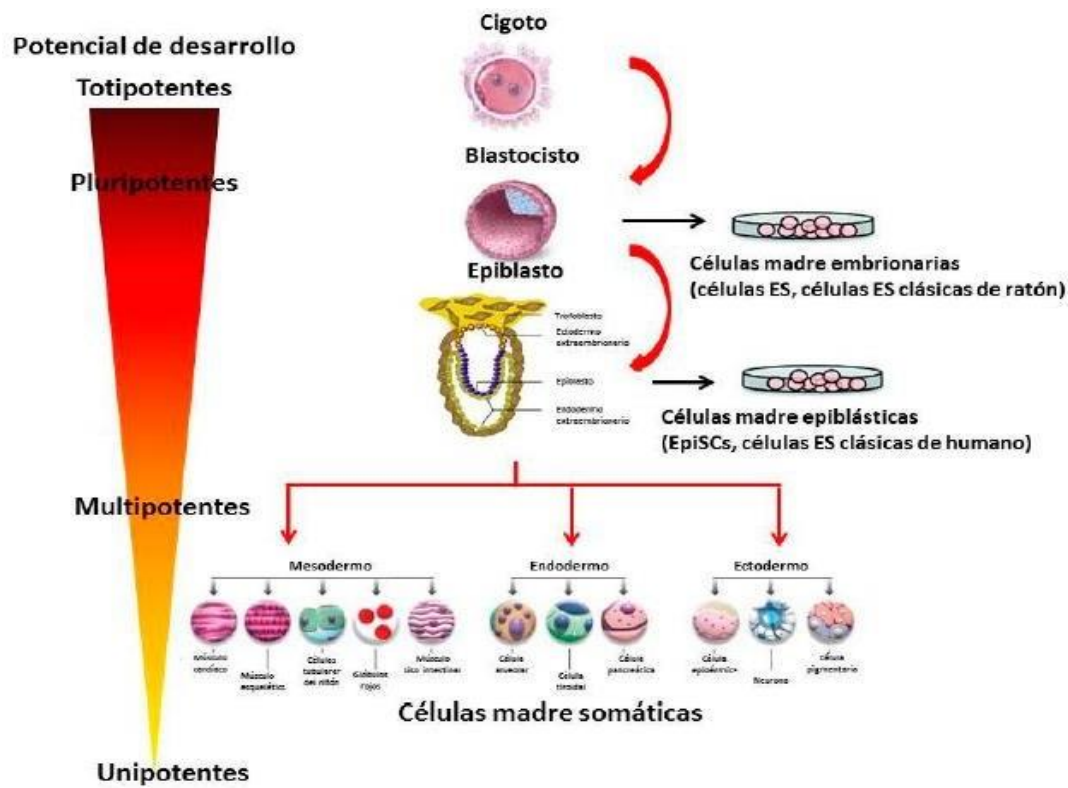


Figura 1. Desarrollo de células de mamíferos. Representación del decaimiento gradual en la potencialidad del desarrollo embrionario con el incremento de la diferenciación desde un cigoto totipotente hasta las células somáticas que conforman un individuo adulto. Tomado y modificado de Lyssiotis et al., 2011 [15].

3.4 Neurogénesis embrionaria en ratones

La neurogénesis embrionaria en ratones empieza generalmente en el día embrionario 8 (E8) y adquiere su meseta alrededor de E14. Entre los días E8-E10, las células neuroepiteliales de la SVZ y de la zona ventricular (VZ) empiezan a alterarse, obteniendo propiedades astrogliales, recibiendo el nombre de células radiales gliales (RGC), por sus características morfológicas y espaciales. Las RGC poseen características de NSC comprometidas con una estirpe celular, pudiendo dar lugar directamente a nuevas

neuronas o crear células progenitoras neurales intermedias (nIPC), que posteriormente mediante división simétrica se diferenciarán a neuronas. Además, para continuar auto renovándose las RGC llevan a cabo una división asimétrica en ambos casos.

Las RGC también pueden participar en la gliogénesis. Durante el desarrollo embrionario tanto las células gliales como las neuronas recién formadas migran hacia la corteza cerebral y forman una red de interneuronas. Para la finalización del desarrollo embrionario, casi todas las RGC han abandonado la VZ y se han desplazado hacia la placa cortical. Aquí terminarán la neurogénesis embrionaria el primer día postnatal (P1) transformándose en astrocitos.

Por otro lado, en la SVZ permanece cierta cantidad de RGC residuales, las cuales estarán comprometidas con la neurogénesis adulta [16].

3.5 Neurogénesis en el cerebro adulto: reposición neuronal en condiciones fisiológicas

Durante el desarrollo embrionario, la totalidad del tejido nervioso se genera a partir de NSC; en el cerebro adulto, poblaciones remanentes muy localizadas de NSC continúan produciendo nuevas neuronas a lo largo de toda la vida del individuo. Éstas son las llamadas regiones neurogénicas, que son fundamentalmente dos, la SVZ [17], situada adyacente al epéndimo en la pared lateral de los ventrículos laterales (VL), y el giro dentado del hipocampo (DG) [3] (Figura 2). En los ratones los NPC migran a través de la ruta migratoria rostral (RMG), desde la SVZ al bulbo olfatorio (OB), donde se diferencian en interneuronas, las cuales colaboran en procesos plásticos de aprendizaje olfativo, mientras que los NPC en el hipocampo, se diferencian cerca de su lugar de origen en neuronas granulares [18].

En el adulto, el proceso de neurogénesis está mediado por señales fisiológicas intrínsecas y extrínsecas. La estimulación cognitiva, el aprendizaje y el ejercicio físico son señales fisiológicas que incrementan la neurogénesis, mientras que el estrés la reduce (Figura 2).

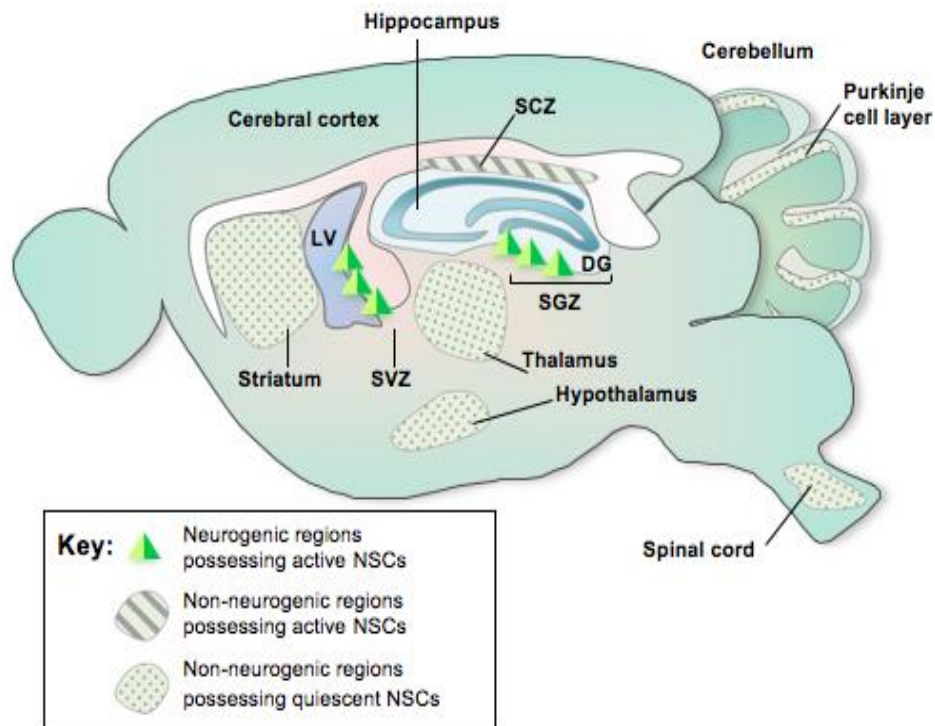


Figura 2. Representación de los nichos neurogénicos y las zonas no neurogénicas en cerebro de un ratón adulto. Existen regiones neurogénicas que poseen NSC activas: en el cerebro adulto, la neurogénesis en la zona subgranular (SGZ) del DG y la SVZ del ventrículo lateral suministran activamente células recientemente generadas. La SGZ y la SVZ se han identificado como regiones neurogénicas espontáneas que poseen NSC autorrenovables y NPC. También se observan regiones no neurogénicas que poseen NSC activas: además de estas dos regiones discretas, la zona subcallosa (SCZ) es la fuente para la generación continua de NSC. Existen regiones no neurogénicas que poseen NSC quiescentes, por ejemplo, informes recientes han sugerido que las NSC pueden estar ampliamente distribuidas en el cerebro adulto [19].

3.6 Neurogénesis en la SVZ

La SVZ es una lámina germinal que se forma durante el desarrollo embrionario, la cual persiste a lo largo de la vida adulta reteniendo su capacidad neurogénica y gliogénica, y dando cobijo a una gran población de células proliferantes. En la SVZ diferenciamos varios tipos de células: neuroblastos proliferantes (células A), células proliferantes lentas (células B), células activas proliferantes (células C) y células ciliares ependimales (células E).

Las células B tienen morfología y ultraestructura astrocítica y expresan marcadores gliales. Éstas pueden estar tanto en estado inactivo (quiescente) o activo. Las células B en estado quiescente no expresan nestina, en contraposición a las células B en estado activo que si expresan nestina. La nestina es una proteína de filamentos intermedios que tradicionalmente ha sido considerada como un marcador de NPC. Las células B activas se

dividen dando lugar a las células C, las cuales se acabarán convirtiendo en neuroblastos migratorios o células A, tras dividirse en varias ocasiones. Estas células A migran a través de la RMG hacia el OB donde se diferencian a interneuronas maduras. Las células E tienen la función de estimular la recirculación del líquido cefalorraquídeo.

Por otra parte, en la SVZ también se producen precursores gliales que, posteriormente en el cuerpo calloso, se diferencian a oligodendrocitos y que participan en la reparación de lesiones [20] (Figura 3).

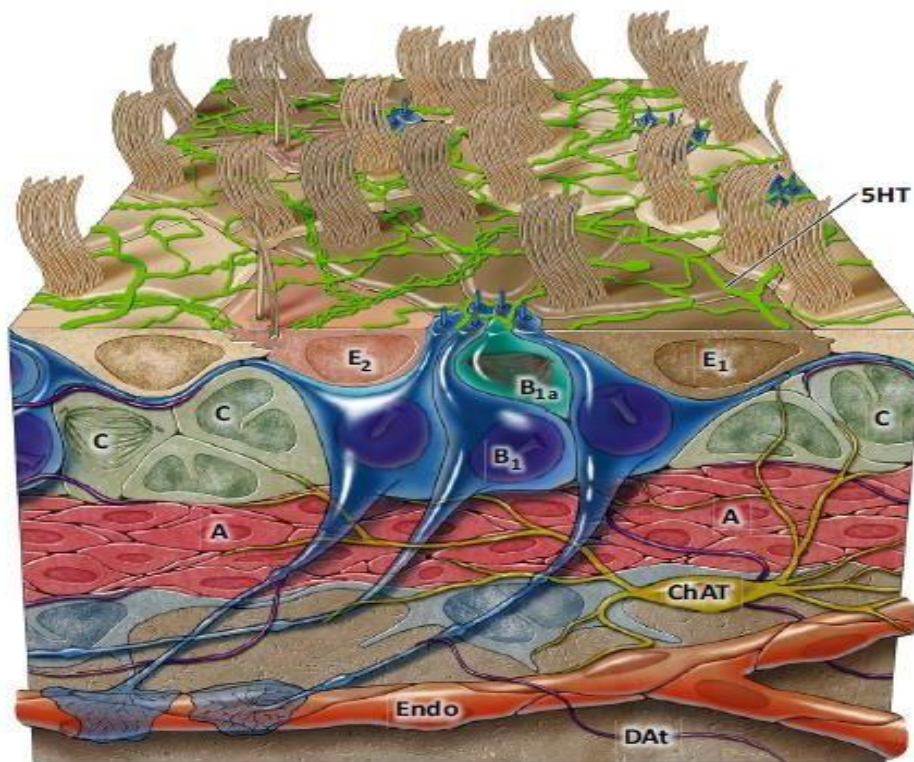


Figura 3. Representación de la SVZ. Observamos los distintos tipos celulares (A, B1 y C). Las células B1 se relacionan con neuronas acetiltransferasa (ChAT) y terminales de neuronas dopaminérgicas (DA) y serotoninérgicas (5HT), con el líquido cefalorraquídeo producido por las células ependimarias (E1 y E2) de alrededor y con los vasos sanguíneos. Tomado de Lim y Álvarez-Buylla, 2014 [21].

3.7 Neurogénesis en el DG

En la SGZ del hipocampo existe otro nicho neurogénico. Según Seri y colaboradores [22] las células madre de esta zona serían una subpoblación de astrocitos que reciben el nombre de células B, parecidas a las células B de la SVZ. Estas células B se dividen dando lugar a las células D, que son NPC, los cuales a su vez proliferan y se diferencian a nuevas

neuronas granulares. Estas nuevas neuronas migran hacia la capa granular donde se diferencian a las células G o neuronas granulares maduras.

3.8 Nicho neurogénico

Para que haya neurogénesis son necesarios dos requisitos: en primer lugar, deben existir NSC capaces de generar neuroblastos [23, 24], y, por otro lado, estas células deben encontrarse en un entorno adecuado, que favorezca la diferenciación hacia la estirpe neuronal. Al conjunto de factores que determinan este entorno se le denomina nicho neurogénico [25].

Por lo que el nicho neurogénico es el microambiente especializado compuesto por una compleja estructura formada por células ancladas a la membrana basal, factores solubles y vasculogénesis concomitante que facilitan la exposición de las NSC [25]. En los nichos neurogénicos se llevan a cabo un conjunto de señales locales que permiten la constante producción de neuronas nuevas [18] y desempeñan papeles críticos para la neurogénesis adulta. En los nichos neurogénicos adultos se puede ver como un neuroepitelio “desplazado”, bolsas de células y señales locales que conservan suficiente carácter embrionario para mantener la neurogénesis de por vida.

Se han distinguido dos tipos de factores que ayudan a la neurogénesis en el nicho neurogénico SVZ del adulto: los factores tróficos y los morfogénicos. Entre los factores tróficos, también llamados factores de crecimiento, encontramos el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF α), ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y con actividad mitogénica sobre los precursores indiferenciados, y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Estos factores tróficos desempeñan una importante función en la comunicación intercelular, siendo su función principal el control externo del ciclo celular con el fin de estimular la proliferación celular, iniciando la mitosis, y la supervivencia celular. Por otro lado, los factores morfogénicos limitan las rutas de diferenciación, distinguiéndose las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), BMP2, BMP4 Y BMP7, las cuales promueven la producción de nuevos astrocitos inhibiendo la neurogénesis [26]. Esto se produce por medio de un receptor endocítico secretado por las células endodiales del nicho neurogénico que actúa sobre específicas BMP. El aumento

de la señalización BMP promueve la diferenciación de las NSC hacia células gliales, inhibiendo de este modo la neurogénesis.

Algo especial del nicho de la SVZ es que en ella existe una proteína llamada Noggin, producida también por las células endoteliales, que inhibe a las BMP por lo que este mecanismo parece servir para controlar la neurogénesis en esta zona. No se puede obviar el papel que juegan distintos neurotransmisores como la serotonina, GABA y dopamina en la regulación de la neurogénesis en la SVZ, lo que incrementa todavía más su complejidad.

Además, hay muchos factores de transcripción que son decisivos en los procesos de proliferación. Entre ellos está el Sox2, expresado por casi todas las células de la SVZ, y que es indispensable para el mantenimiento de la auto renovación de las células madre al interactuar con otros factores de transcripción como PRX1 y TLX [21]. Las NSC al diferenciarse y comprometerse con alguna de las estirpes neurales, dejan de expresar este marcador.

3.9 Neurogénesis en el cerebro adulto: reposición neuronal en condiciones patológicas

En condiciones patológicas, como las lesiones cerebrales traumáticas [27] o las enfermedades neurológicas [12], se produce un incremento de la neurogénesis en los nichos neurogénicos, dando lugar a la producción de nuevos neuroblastos que, eventualmente migran a la zona lesionada, pero éstos en la mayoría de los casos mueren. Por lo que la capacidad de regeneración es muy escasa, habiéndose descrito una reposición neuronal de entre el 0.2% y el 10% [28, 29]. Por otro lado, en el entorno de la lesión aparecen células con características de NPC que, a pesar de proliferar y crear progenitores neurales indiferenciados, apenas generan neuronas [30, 31]. Una de las alternativas que podrían ayudar a solucionar o al menos a atenuar los problemas clínicos que plantean las enfermedades que ocasionan pérdida neuronal es el trasplante de NSC. Se ha intentado como estrategia para conseguir este cometido el trasplante de NSC de origen embrionario [32], NSC de animales adultos [33], o NSC sometidas a distintos grados de diferenciación in vitro. Mediante estos trasplantes se ha llegado a la conclusión de que las NSC que se implantan en las zonas neurogénicas darán lugar a neuroblastos y finalmente a neuronas,

mientras que las NSC que se implantan en regiones no neurogénicas comenzarán la diferenciación glial [34, 35].

Cuando se produce una lesión del SNC, las NSC se activan favoreciendo la formación de una cicatriz glial alrededor de la zona lesionada [36]. Aunque el objetivo de esta cicatriz es evitar que el daño continúe [37], las células que la componen fabrican una matriz extracelular que no permite la formación de axones de nuevas neuronas, ni la migración de células a esta zona [36, 38, 39]. Dentro de esta cicatriz se aprecia un aumento importante de la proliferación de células gliales [40].

En definitiva, la reposición de las neuronas muertas en una región lesionada del SNC requiere modificar el microambiente de dicha región para asemejarlo a un nicho neurogénico, donde tanto las NSC endógenas como las trasplantadas pudieran diferenciarse a neuronas maduras y funcionales. Para eso es necesario establecer qué moléculas favorecen o impiden la neurogénesis.

Investigaciones recientes en este campo han descrito múltiples factores de crecimiento y señales extracelulares en los nichos neurogénicos fisiológicos que hacen posible y estimulan la creación de nuevas neuronas [25, 41, 42]. Aunque estos factores a su vez actúan sobre rutas de señalización intracelulares que no están tan explícitamente descritas, pero sobre las que podría ser más efectivo actuar a la hora de favorecer la neurogénesis.

3.10 Proliferación glial tras un daño traumático en el SNC de un ratón adulto

Ante un daño cerebral traumático se desencadena una respuesta inflamatoria que se caracteriza por gliosis, proliferación celular y muerte celular en la zona pericontusional [43]. Se ha examinado la respuesta proliferativa que se origina tras un daño cerebral traumático analizando el fenotipo de las células en división en diferentes tiempos post-lesión. Los estudios realizados proponen que:

1. Existe una proliferación celular que corresponde tanto temporal como espacialmente con un daño traumático en la corteza cerebral.

Se ha demostrado que hay un incremento de las células proliferantes (que se reconocen mediante marcaje con un análogo de timidina bromodeoxiuridina; BrdU⁺)

en la zona pericontusional y en las zonas cerebrales ipsilaterales de la zona lesionada (paredes de los VL, cuerpo calloso, hipocampo y córtex cerebral). En el primer día tras el daño traumático ya se evidencian células BrdU⁺ en la zona pericontusional, habiendo un pico máximo en los tres días posteriores a la lesión [44].

2. La microglía activada es la población celular más proliferativa en los tres días posteriores a la lesión [43].

Existe un cambio fenotípico en la microglía desde la forma ramificada quiescente a la activada en el primer día post-lesión, con morfología ameboide, similar a la de los macrófagos. Esto se transcribe en un incremento de los marcadores BrdU⁺/iba-1⁺, evidenciándose un pico máximo en los tres días posteriores a la lesión en la zona perilesional.

3. Después de un daño cerebral traumático se percibe, además, un incremento de la población astrocitaria. En la región perilesional se observa una cicatriz glial que tiene como primera función recomponer el tejido perdido [43].

4. Se hallan neuroblastos proliferantes a los tres días post-lesión, que son apenas detectables y no perduran en el tiempo [43].

5. Las células marcadas NG2 (precursores de oligodendrocitos), son las más proliferativas a las 24 horas post-lesión. El primer día el 47% de las células BrdU⁺ suelen ser NG2⁺, disminuyendo hasta un cuarto de su valor a los 7 días post-lesión [43].

Todos estos puntos plantean que los daños traumáticos en el SNC van acompañados de una respuesta rápida, que facilita la formación de astrocitos, microglía y células precursoras de oligodendrocitos (OPC), mientras que la reposición neuronal se reduce de escasa a inexistente dependiendo del tipo y la agudeza de la lesión.

3.11 Proteínas Quinasas de tipo C (PKC) y Neurogénesis

Entre las posibles dianas intracelulares sobre las que interferir para estimular la neurogénesis se encuentran las quinasas de la familia de las PKC, que cumplen un importante papel en la transducción de señales intracelulares relacionadas con el ciclo

celular, diferenciación y apoptosis [45, 46], aunque cada una de las isoformas tiene un papel distinto en función del tipo y contexto celular.

Las PKC son una familia de diez serina/treonina quinasas que pertenecen a la superfamilia AGC de proteínas quinasas y que dependen de la unión a fosfatidilserina para su actividad. La estructura de todas las PKC es similar y éstas constan de un dominio regulador (en el extremo amino terminal, que determina las diferencias entre las PKC) y un extremo catalítico (en el extremo carboxilo terminal, muy similar en todas las PKC). El dominio regulador de las PKC puede incluir a su vez dos dominios:

- Dominio C1: presente en todas las isoformas de PKC. Es el responsable de la unión al diacilglicerol (DAG) y a los ésteres de forbol.
- Dominio C2: que actúa como sensor de calcio.

Atendiendo a su estructura y requerimiento de cofactores adicionales y calcio, las diez isoenzimas que componen la familia de las PKC se clasifican en 3 grandes subfamilias:

- Proteínas quinasas C clásicas o convencionales (cPKC): está formada por las isoenzimas PKC α , PKC β 1, PKC β 2 y PKC γ . Contienen los dominios C1 y C2, son activadas por DAG, fosfatidilserina, ésteres de forbol y poseen un sitio de unión a calcio en C2.
- Proteínas quinasas C nóveles (nPKC): está formada por las isoenzimas PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ . Contienen el dominio C1, son independientes de calcio y son activadas por DAG, fosfatidilserina y ésteres de forbol.
- Proteínas quinasas C atípicas (aPKC): en esta subfamilia se agrupan las PKC ζ , PKC ι y PKC λ . Contienen un dominio C1 que no es sensible a DAG y no contienen el dominio C2, por lo que tampoco es sensible al calcio, sólo responden a la presencia de fosfatidilserina. Su función es regulada por interacciones proteína-proteína (Figura 4).

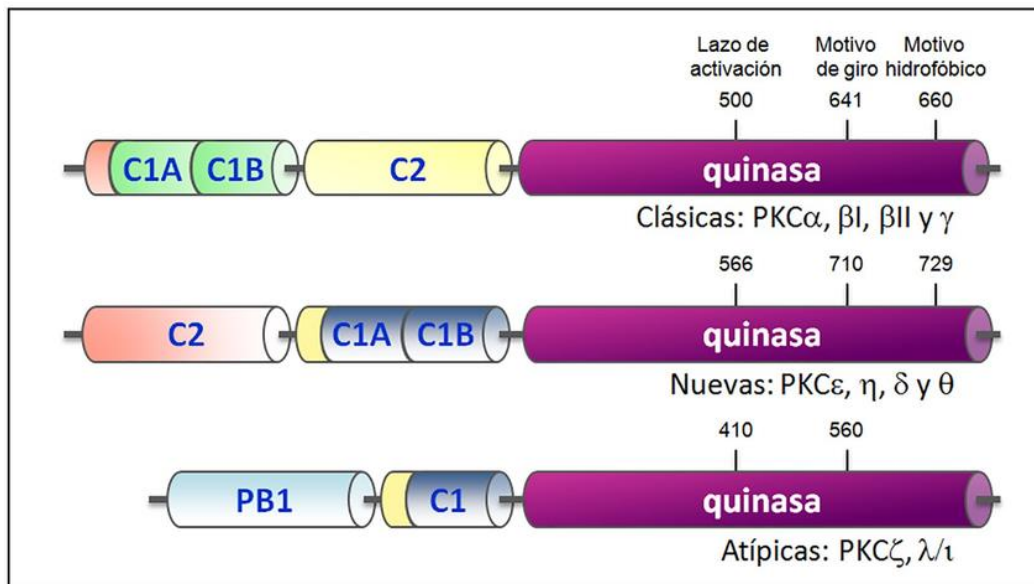


Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de las isoenzimas de la PKC. Se muestran los distintos dominios que la forman. En el extremo amino terminal se encuentra la región reguladora, con el dominio pseudo-sustrato, y los dominios C1 y C2, que unen diferentes cofactores según el tipo de isoenzima. El extremo carboxilo terminal contiene la región catalítica de la enzima, con el dominio quinasa de unión al ATP y al sustrato. Este dominio catalítico posee además el lazo de activación, un motivo de giro y el motivo hidrofóbico que sólo desaparece en las aPKC [47].

La activación de las PKC se desencadena por diversos compuestos, como factores de crecimiento, hormonas y otras señales extracelulares recogidas por distintos receptores, a través fundamentalmente de la fosfolipasa C, la cual hidroliza fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol y produce los segundos mensajeros DAG e inositol trifosfato (Ins-1,4,5-P3) [48]. Los niveles de DAG en la membrana sufren una elevación transitoria debido a la acción de la fosfolipasa C [49]. Así, mientras el DAG queda asociado a la membrana, el Ins-1,4,5-P3 es soluble y se libera al citosol, donde provoca el aumento de la concentración de calcio, lo cual afecta a numerosos procesos intracelulares, entre otros la migración de la PKC a la membrana para ser activada por el DAG. Precisamente, algunas PKC se han identificado como una de las dianas básicas del DAG, de forma que se activan cuando interaccionan con este compuesto [50].

Las PKC tienen la capacidad de regular la progresión del ciclo celular de forma positiva o negativa. Esta regulación por medio del sistema enzimático de PKC es muy compleja, con efectos que implican la participación de múltiples moléculas regulatorias del ciclo celular como ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK) y ejerciendo efecto

sobre varias fases del ciclo celular. El efecto observado es distinto dependiendo de varios factores tales como la diana específica del ciclo sobre el que actúa, de la isoenzima partícipe, la duración de la activación de la PKC, el entorno de la señalización y el tipo de célula [45].

La función de las PKC en NPC ha sido poco estudiada, pero hay evidencias de que en cultivos neurales primarios la expresión de las diferentes isoformas de PKC definen la especificidad de las respuestas celulares a los factores de crecimiento en una misma célula [51].

En relación con el SNC, la activación de PKC está relacionada con el control de la actividad canales iónicos, la sensibilidad de receptores y el desarrollo del árbol dendrítico neuronal [52]. De este modo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la activación general de PKC estimula la proliferación de NPC en la SVZ y el DG, mientras que la inhibición con bisindolilmaleimida I (GO6850) (un inhibidor general de PKC que actúa fundamentalmente sobre α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ , δ y ϵ) dirige el destino de estos precursores a neuronas [53]. Estudios de otros laboratorios confirman, por un lado, que la activación de PKC ϵ promueve la diferenciación de los NPC hacia células gliales y disminuye la diferenciación a neuronas [54], y por otro lado que la activación de aPKC también dirige el destino de los NPC a neuronas [55].

En estudios previos de nuestro laboratorio, han encontrado compuestos, en concreto 2 diterpenos: prostatina y ER272, que son activadores no tumorigénicos de PKC y promueven la neurogénesis en el DG y SVZ. Este efecto se revierte con el inhibidor general de PKC [56].

También se han observado alteraciones en los niveles de PKC en enfermedades neurodegenerativas. Un ejemplo de esto se observa en la enfermedad de Alzheimer, donde la actividad de PKC β y ϵ está deprimida en la corteza temporal [57], y en casos de neurodegeneración aguda, en las zonas lesionadas hay un incremento de algunas isoformas de PKC.

Además de la gran cantidad de señales que actúan sobre el nicho neurogénico correspondiente a la SVZ, destacan el bFGF y el EGFR, que conforman señales de gran importancia en la neurogénesis y proliferación en el desarrollo de la corteza cerebral [58].

Estos factores de crecimiento estimulan a receptores tirosina-quinasa (RTK). Cuando el factor se une a su receptor, éste se fosforila y dimeriza activando cascadas de señalización intracelular [59].

Los RKT activan la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/AKT), la vía de las Ras/Raf/proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK/Erk) y la vía de la fosfolipasa C γ (PLC γ) que a su vez puede activar a las proteínas quinasas A, C y G. Los RTK de los NPC regulan la histogénesis del cerebro durante el desarrollo embrionario, mientras que en el adulto regulan el control de los nichos neurogénicos determinando la renovación o la diferenciación celular [60].

3.12 Moléculas activadoras de PKC

Existen moléculas de origen químico capaces de activar PKC y estimular la proliferación de NPC. La importancia de estas moléculas radica en que podrían fomentar en la creación de un nicho adecuado en regiones lesionadas del SNC, o bien permitir el incremento de las poblaciones de NPC.

Los ésteres de forbol son capaces de imitar los efectos del DAG y estimular las cascadas de señalización dependientes de cPKC y nPKC. Aunque a diferencia del DAG, los ésteres de forbol no se metabolizan rápidamente dando lugar a una activación de las PKC más duradera. Se ha establecido que sólo las moléculas activadoras de PKC que generan una translocación sostenida de la membrana plasmática son las que poseen una actividad promotora de tumores [61]. Por lo que el descubrimiento de que algunas PKC son también receptores de alta afinidad para ésteres de forbol [62], los cuales son moléculas promotoras de tumores [63], ha establecido su implicación en los procesos de carcinogénesis y también ha proporcionado herramientas farmacológicas con las que manipular las PKC tanto in vitro como en sistemas celulares [64]. Esto pone de manifiesto la importante función que desempeñan las PKCs en los mecanismos de señalización celular y, a su vez, la relevancia del estudio de esta proteína con relación a poder controlar estos procesos. Como se ha indicado anteriormente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el 13-O-acetil-12-O-miristilforbol (PMA) incrementa el área de neuroesferas en cultivos celulares de una forma dosis-dependiente, sin influir en el número de éstas, lo que demuestra que el PMA es capaz

de estimular la proliferación clonal a partir de un único precursor neural de modo que no impacta en el número de precursores iniciales activados. La prostatina induce la proliferación de NPC *in vitro* en una proporción similar al PMA sin afectar la capacidad de las NPC de diferenciarse hacia el linaje neuronal inmediatamente después del tratamiento. La prostatina, además de estimular la proliferación, tiene un efecto positivo en la supervivencia celular. Los efectos de la prostatina son dependientes de PKC y estas quinasas se pueden activar para estimular la proliferación de las NPC [56]. La prostatina también ejerce su efecto *in vivo* si se aplica de forma directa en el ventrículo. Por todo esto, la prostatina es considerada como un agente de especial interés para el tratamiento de muchas enfermedades que cursan con pérdida neuronal, que a diferencia del PMA no tiene capacidad tumorigénica, lo mismo sucede con otros agentes patentados por nuestro grupo de investigación como el 12-desoxyforbol ER272 [56].

3.13 PKC y diferenciación

Teniendo en cuenta el papel de la activación de PKC sobre la proliferación de los NPC tanto *in vivo* como *in vitro*, parece lógico pensar que la inhibición de PKC pudiera estar ejerciendo un papel determinante en la diferenciación de los NPC, bien a glía o a neuronas y en este sentido, estudios recientes demuestran que la activación de PKC ϵ favorece la diferenciación glial [54] del mismo modo que la activación de PKC ζ favorece la diferenciación a neuronas de los NPC [55]. Además se observó que la inhibición general de PKCs dirige la diferenciación de los NPC hacia la estirpe neuronal, siendo PKC ϵ la candidata más prometedora para realizar esta función [53].

3.14 Barrera hemato-encefálica (BHE)

Las neuronas del SNC se comunican mediante una combinación de señales químicas y eléctricas, siendo necesaria una estricta homeostasis tanto en las regiones axónicas como de sinapsis, para el funcionamiento adecuado del parénquima cerebral. En gran parte, esto se logra, debido a la presencia de la BHE [65] (Figura 5).

La BHE es una de las barreras biológicas más selectivas e impermeables en mamíferos, teniendo la capacidad de separar el plasma sanguíneo del líquido intersticial.

Aunque está formada por diversos tipos de células, las células endoteliales son las que actúan como barrera principal. Además, las células endoteliales se comunican con otras adyacentes a ellas, tales como astrocitos, pericitos, microglía, neuronas, y otros componentes del parénquima cerebral, constituyendo la denominada “unidad neurovascular” (NVU) [66]:

- Células endoteliales: Sostienen la BHE. Por un lado, presentan proteínas transportadoras y receptores específicos, posibilitando el control de la entrada y salida de metabolitos a través de ellas. Por otro lado, poseen estrechas uniones intercelulares con alta resistencia eléctrica, y ausencia de fenestraciones, haciendo posible solo el transporte por difusión pasiva de iones y solutos de muy pequeño tamaño [66].
- Astrocitos: Gracias a sus prolongaciones de la porción distal rodean a las células endoteliales e interactúan con ellas, con el fin de regular los niveles de metabolitos entre el plasma y el líquido extracelular. Esto es posible gracias a la presencia de acuaporinas que posibilitan la regulación de la cantidad de agua existente en el parénquima. También poseen la función de mantener y proteger a las neuronas, debido al control que desempeñan sobre las concentraciones de neurotransmisores y iones, para mantener el balance homeostático [66].
- Pericitos: Células de origen mesodérmico, perivasculares y esenciales en la integridad de la BHE. Emiten unas prolongaciones que rodean las paredes de las células endoteliales. Se encargan de la regulación del calibre vascular y flujo sanguíneo cerebral [66].
- Microglía: Proviene de precursores hematopoyéticos originados en el saco vitelino, y que migraron al SNC. Ejercen de principal línea de defensa después de la BHE, y desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune innata del SNC. En relación con el control de la homeostasis se desconoce cómo interactúan con las células endoteliales [66].

- Neuronas: Poseen prolongaciones axónicas que conectan con el músculo liso vascular. Además, regulan el calibre vascular y flujo sanguíneo cerebral gracias a las moléculas vasoactivas que contienen [65].
- Membrana basal: Compuesta por un conjunto de proteínas estructurales sintetizadas por pericitos, astrocitos y células endoteliales, que más tarde secretan hacia la matriz extracelular. Colabora en la regulación de la comunicación entre los componentes de la NVU, y además participa en el proceso de diferenciación de los pericitos [66].

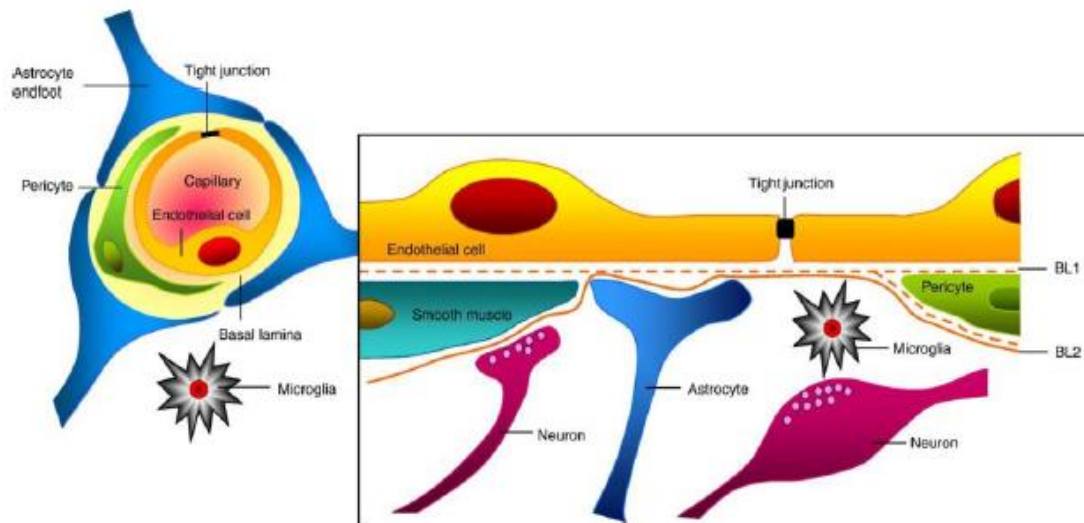


Figura 5. Asociaciones celulares en la NVU: Representación esquemática de la estructura de la BHE (célula endotelial, pericito y prolongación astrocítica), así como de las interacciones entre distintas células que componen la NVU. Tanto las células endoteliales como los pericitos contribuyen a la formación de una lámina basal perivascular (BL1) que difiere, en composición, de la matriz extracelular de las prolongaciones astrocíticas (BL2). Los procesos astrocíticos forman una red compleja que rodea por completo los capilares. Esta asociación tan cerrada es importante para la inducción y mantenimiento de las propiedades de la BHE. Tomada y modificada de (Abbott, N.J., et al., Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(1): p. 13-25) [65].

Funciones de la BHE:

- Mantener una concentración de iones óptima para el funcionamiento de las señales sinápticas [65].
- Imposibilitar el paso de grandes cantidades de glutamato desde el torrente sanguíneo, y, por consiguiente, la neurotoxicidad asociada a éste [65].

- Frenar el paso de macromoléculas hacia el SNC. El paso de grandes cantidades de albúmina, protrombina y plasminógeno podría deteriorar el parénquima ocasionando apoptosis celular, ya que el contenido de proteínas en el SNC es mucho menor que en el plasma [65].
- Proteger al SNC del paso de toxinas circulantes en sangre, tales como metabolitos endógenos, proteínas o xenobióticos ingeridos en la dieta [65].
- Nutrición cerebral. La presencia de transportadores específicos expresados en las células endoteliales de la BHE permite el suministro de los nutrientes y metabolitos necesarios para el correcto funcionamiento del SNC, a pesar de ser esta escasamente permeable a estas sustancias [65].

3.15 Vía de administración intranasal

Se basa en la administración de una molécula por medio de la porción superior de la cavidad nasal [67]. Las vías principales por las que el fármaco accede al SNC comprenden a los nervios trigémino y olfatorio [68].

El nervio olfatorio se alcanza directamente mediante la lámina cribosa del etmoides, y desde ahí entra directamente en el cerebro. El nervio trigémino puede entrar al cerebro a través de la lámina cribosa (vía anterior) y a través del puente troncoencefálico (vía posterior) [67, 68].

El transporte de sustancias mediante ambos nervios se lleva a cabo por mecanismos intracelulares y extracelulares. Por un lado, los mecanismos intracelulares se fundamentan en la absorción del fármaco por las neuronas sensitivas del nervio olfatorio (OSN), por endocitosis y difusión. Las OSN pueden endocitar diversas sustancias, como virus y moléculas de gran tamaño. Sin embargo, este mecanismo al ser lento puede necesitar desde algunas horas hasta varios días para conseguir el efecto terapéutico significativo. Por otro lado, los mecanismos extracelulares son mucho más rápidos. Esta variabilidad en la velocidad de transporte propone la existencia de compuestos extracelulares a lo largo de los trayectos de los nervios trigémino y olfatorio, los cuales hacen posible la conducción del fármaco hacia el SNC [68] (Figura 6).

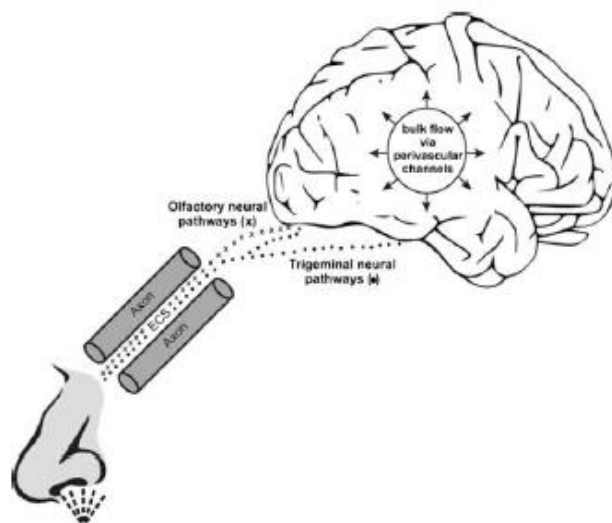


Figura 6. Esquema de la vía de administración intranasal. Abreviaciones: ECS (espacio extracelular). Tomado y modificado de (Chapman, C.D., et al., Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res*, 2013. 30(10): p. 2475-84) [68].

Habitualmente, el tratamiento de los trastornos neurológicos se ha llevado a cabo mediante la administración de un fármaco por vía oral o sistémica, las cuales poseen múltiples inconvenientes. El más importante es que muchas moléculas no pueden atravesar la BHE, y las que lo logran, al poseer una biodisponibilidad demasiado reducida, el efecto a nivel del SNC va a ser reducido. Además, la interacción de dichas moléculas con otros órganos puede conllevar a diversas reacciones adversas. Una alternativa a estas vías de administración es la inyección intracerebroventricular, por la que el fármaco entra directamente al cerebro, pero no aplicable en la clínica puesto que es una técnica muy invasiva que supone muchos riesgos.

Un tratamiento alternativo es la administración intranasal, ya que no es un mecanismo invasivo e incrementa la biodisponibilidad del fármaco en el SNC. Mediante esta vía se consiguen, de forma rápida, niveles altos de estos compuestos en el SNC, y, a diferencia de la administración sistémica, se previenen efectos secundarios en otros órganos [68].

Es un procedimiento muy usado en la actualidad para suministrar fármacos al SNC. Se ha descrito que la vía de administración intranasal de sustancias biológicas posibilita

traspasar la BHE y la distribución de las sustancias a distintas regiones del cerebro, como LA SVZ y DG. Este es el caso del IGF o de la insulina [69, 70].

3.16 PKC, latiranos, neurogénesis y regeneración de lesiones cerebrales

Hoy en día, la pérdida de neuronas producida tras un daño cerebral originado por una lesión focal traumática es irreversible, por ello y con el fin de regenerar el tejido cerebral afectado, es necesario desarrollar estrategias que induzcan la reposición neuronal en la zona lesionada. El avance actual de estrategias que se fundamentan en el uso de células madre para potenciar la neurogénesis en las lesiones es prometedor. A pesar de ello, la inflamación inherente de los tejidos dañados impide la producción de neuronas en las zonas lesionadas del cerebro adulto, por ende, es imprescindible intervenir este proceso inflamatorio e impulsar la generación de nuevas neuronas.

Teniendo en cuenta esta necesidad, estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio han demostrado que algunas isoenzimas de la familia de PKC podrían resultar dianas farmacológicas apropiadas para favorecer la neurogénesis y que a partir de moléculas como diterpenos con estructura de 12-desoxiforbol (o latiranos) se podrían componer fármacos que por medio de la activación de las isoenzimas de PKC indujesen la neurogénesis en el tejido lesionado.

En este trabajo, pretendemos estudiar el efecto del latirano 7,8,12-O-triacetil-3-O-(4-metoxifenil) acetilingol (EOF2), sobre la actividad de PKC y analizar si este compuesto tiene la capacidad de modular la neurogénesis en lesiones mecánicas de la corteza cerebral adulta. Este compuesto ha sido patentado por nuestro grupo de investigación y ha obtenido resultados muy prometedores que se encuentran actualmente en proceso de publicación. En este trabajo pretendemos investigar el efecto de este compuesto en la migración de los precursores neurales (NPC) además de instaurar una nueva forma de administración de fármacos con acción diferenciadora.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis

La administración intranasal de EOF2 contribuye a la regeneración del tejido lesionado fomentando la migración de los NPC en dirección a la zona perilesional de ratones adultos.

Rationale

El reemplazo neuronal en regiones dañadas del SNC adulto es prácticamente inexistente. A pesar de que tras una lesión se desencadena una respuesta neurogénica que favorece la migración de neuroblastos desde regiones neurogénicas hacia la lesión y que se activan células madre neurales facilitando la producción de precursores indiferenciados, los neuroblastos no alcanzan la lesión y los NPC no generan neuronas sino células de glía. El problema reside en la existencia de moléculas de señalización, secretadas al entorno de las células madre neurales, como consecuencia de la inflamación, que impiden la migración de neuroblastos desde regiones neurogénicas y que promueven la diferenciación de los NPC a células de glía a expensas de la formación de neuronas. Las PKC son proteínas involucradas en la secreción de moléculas neurogénicas y por este motivo, parece lógico analizar el efecto de estas proteínas sobre la neurogénesis en lesiones y buscar fármacos que actuando sobre estas proteínas promuevan la generación de nuevas neuronas en lesiones cerebrales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración intranasal de EOF2 o simplemente vehículo (control) sobre la neurogénesis tras una lesión en la corteza motora primaria de ratones adultos a partir de precursores que migran desde regiones neurogénicas.

5.2 Objetivos específicos

- En un modelo de lesión traumática de la corteza motora primaria, estudiar el efecto de la administración intranasal de EOF2 o únicamente vehículo, sobre el número de células marcadas con BrdU⁺ en regiones neurogénicas y que posteriormente han migrado hacia la lesión. Se analizará su diferenciación (hacia la estirpe neuronal y hacia la estirpe glial) en el perímetro de la lesión.
- Estudiar el efecto de la administración intranasal de EOF2 o únicamente vehículo, sobre el número de células marcadas con BrdU⁺ y diferenciación (hacia la estirpe neuronal y hacia la estirpe glial) dentro de la zona subventricular (SVZ) tras la realización de una lesión mecánica en la corteza motora de ratones adultos.
- Estudiar el efecto de la administración intranasal de EOF2 o únicamente vehículo, sobre la proliferación (células marcadas con BrdU⁺) y diferenciación (hacia la estirpe neuronal y hacia la estirpe glial) de los NPC en el Giro Dentado (DG) del hipocampo después de la realización de una lesión mecánica en la corteza motora de ratones adultos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental con ratones en el Servicio Central de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz en el área de fisiología de la Facultad de Medicina.

6.2 Diseño experimental

El estudio de la neurogénesis en lesiones a partir de precursores migrantes desde la SVZ se realizará en ratones adultos en los que se realizarán lesiones mecánicas controladas de la corteza motora primaria. Con el fin de analizar la migración de precursores hacia la lesión desde regiones neurogénicas, se utilizará un patrón de marcaje específico de con

BrdU. Este consistirá en 1 inyección diaria de BrdU durante 3 días comenzando 6 días antes de la realización de la lesión. En estas condiciones, sólo se incorporará BrdU dentro de las células proliferantes en regiones neurogénicas del cerebro adulto. Posteriormente, se esperará tres días adicionales para que el BrdU se elimine del organismo animal y transcurridos estos tres días se realizarán las lesiones. De este modo, todas las células marcadas con BrdU en el perímetro de la lesión son precursores que necesariamente han migrado desde regiones neurogénicas.

Se utilizarán dos grupos experimentales:

- ratones lesionados tratados con vehículo intranasal (grupo control) durante 14 días tras la lesión. Los animales se sacrificaron en el día 14 post lesión.
- ratones lesionados tratados con EOF2 intranasal durante 14 días tras la lesión. Los animales se sacrificaron en el día 14 post lesión.

6.3 Animales de experimentación

Se emplearon 6 ratones adultos por grupo experimental de la cepa CD1, suministrados por el animalario de la universidad de Cádiz, donde se realizaron todas las intervenciones quirúrgicas anteriores al sacrificio. Los animales se colocaron en jaulas individuales con pienso y agua ad libitum con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.4 Aspectos éticos

La experimentación que se propone en este proyecto implica el uso de animales de experimentación. Los protocolos establecidos para el uso de animales de experimentación están recogidos en el artículo 20.2 del Decreto 65/2012 de 13 de marzo el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales usados en experimentación y otros fines científicos, abarcando la docencia.

Para llevar a cabo este proyecto se ha diseñado una estrategia experimental conforme con la regulación recogida en el Real Decreto 53/2013, tomándose unas medidas básicas.

Pensando la necesidad de la investigación y experimentación animal para el progreso científico, aceptamos que no es motivo suficiente para justificar cualquier tipo de experimento. Por lo que ajustamos la n con el objetivo de conseguir que el estudio fuera estadísticamente significativo usando el menor número de animales posibles (siguiendo siempre el principio de las 3R). Además, todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo con anestesia con el fin de causar el menor sufrimiento posible a los animales, que continuó en el postoperatorio. Sí se llevaron a cabo maniobras diarias de “handling”, que reducen o anulan el estrés por manipulación y administración de los tratamientos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del SEPA.

La actuación sobre los animales la realizaron investigadores capacitados y acreditados conforme a la normativa vigente.

Al ser un proyecto encuadrado en el tipo II de los establecidos en el Real Decreto 53/2013, se ha obtenido previamente la aprobación al Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de la UCA de la Junta de Andalucía.

6.5 Lesión en la corteza cerebral

Los ratones adultos se anestesiaron con una combinación de ketamina (100 mg/kg; Imalgene® 500, Merial) y xilazina (10mg/kg; Rompún® 2% Bayer). Posteriormente se colocaron en el aparato estereotáxico, asegurados por barras en las orejas y con los incisivos inmovilizados. Se les realizó una incisión en la piel anteroposterior en la línea media permitiendo visualizar el cráneo. Una vez sacado el periostio se adoptó el bregma (punto anatómico del cráneo en donde la sutura coronal se interseca con la sutura sagital) como punto de referencia. A continuación, se les practicó una craneotomía 1,4 milímetros anterior y 1,5 milímetros lateral derecha al bregma. La corteza motora primaria fue lesionada con la inserción de una broca de 0,7 milímetros de diámetro hasta alcanzar una profundidad de 1 milímetro. Finalmente se cerró la herida con cemento quirúrgico y se suturó. Los animales fueron colocados de forma individual bajo las condiciones instauradas con anterioridad.

6.6 Procedimiento de administración y marcaje con BrdU⁺

Los ratones lesionados fueron inyectados intraperitonealmente con BrdU⁺. El BrdU⁺ es un nucleótido análogo a la deoxitimidina, que se incorpora al ADN de las células que se están dividiendo en el momento de la inyección, o bien se han dividido recientemente. El procedimiento experimental utilizado se realizó siguiendo un paradigma para marcar células en división activa en cerebro en condiciones fisiológicas normales, de forma que al detectar células en el perímetro que rodea a la lesión estas sean exclusivamente células migratorias y no aquellas originadas en el contorno de la lesión "*in situ*". Para esto se inyectó BrdU⁺ los días 6, 5 y 4 anteriores a la realización de la lesión. Para asegurarnos de que solo las células de los nichos neurogénicos habían sido marcadas dejamos 3 días de lavado antes de realizar las lesiones (día 0). Posteriormente se procedió a realizar la lesión y a la administración intranasal de los compuestos EOF2 (5 µM) o únicamente vehículo durante 14 días.

6.7 Preparación del tejido

En primer lugar, se procedió al sacrificio de los ratones; se anestesiaron con Dolethal (120 mg/kg), de la casa comercial Vetoquinol, y se perfundieron transcardíacamente con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (0,1M). A continuación, se extrajeron los cerebros y se crioprotegieron con sacarosa al 30% durante toda la noche. Al día siguiente se procedió a la ejecución de cortes coronales de 30 µm de grosor y se conservaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Glicerol (1:1) a -20°C. Por un lado, el PBS es una solución acuosa y salina, cuya osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos y cuyos grupos fosfato mantienen el pH estable. Por otro lado, el Glicerol impide que los cortes se congelen por refrigeración.

6.8 Inmunohistoquímica

Se escogieron series completas, escogiendo una sección de cada 5 consecutivas, con 150 µm de diferencia entre secciones elegidas, que abarcan toda la sección de la SVZ, del DG del hipocampo y de la lesión. Estos cortes se lavaron con PBS para eliminar los restos de glicerol y, seguidamente, se incubaron con tampón citrato (SSC 2X) formamida (1:1/S:S)

durante 2 horas a una temperatura de 65°C. De esta forma, el tejido permite el paso a los anticuerpos que deben atravesar las membranas, ya que el anticuerpo anti-BrdU⁺ debe penetrar en el núcleo.

A continuación, se lavaron con SSC 2X durante 15 minutos se incubaron en ácido clorhídrico (HCl, 2N) durante media hora a una temperatura de 37°C. Después se lavaron en tampón borato (realizando 3 lavados de 15 minutos), de pH 8,4, con la finalidad de neutralizar la carga ácida de la solución anterior. Se volvieron a lavar con PBS, y por último se incubaron en una solución de saturación con PBS, albúmina sérica bovina (BSA) al 2,5% Tritón X 100 al 0,1% durante una hora, facilitando la especificidad de los anticuerpos que íbamos a usar.

Se procedió finalmente a la incubación de los cortes histológicos con los anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Estos anticuerpos primarios son los encargados de marcar los distintos tipos celulares. Los anticuerpos primarios que usamos en nuestro estudio son los siguientes (Tabla 1):

- Anticuerpo anti-BrdU. Se une a las células que han incorporado análogo de timidina (BrdU). Marca células proliferantes.
- Anticuerpo anti-DCX. Se une a la doblecortina (DCX), el cual es un componente de microtúbulos que se encuentra en los neuroblastos. Posee la capacidad de ofrecer a las células una cierta polaridad y va desapareciendo a medida que los neuroblastos maduran hasta formar neuronas. Marca neuronas inmaduras de reciente aparición.
- Anticuerpo anti-GFAP. Se une a las células que contienen proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Es un componente de los filamentos intermedios que se expresa en células madre troncales y sobre todo en astrocitos.

Al día siguiente se lavan los cortes con PBS, un mínimo de 4 veces durante 5 minutos, y se procede a la incubación de los anticuerpos secundarios (Tabla 1). La incubación se llevó a cabo durante una hora, en agitación, oscuridad y a temperatura ambiente.

Finalizadas las incubaciones con los anticuerpos secundarios lavamos de nuevo los cortes con PBS y los montamos en distintos portaobjetos con una solución específica para

fluorescencia denominada Fluoro-Gel. Para la observación y toma de fotografías utilizamos un microscopio confocal ZEISS. Dichas fotografías fueron examinadas y analizadas con el programa *ImageJ*.

CÉLULAS MARCADAS	ANTICUERPOS PRIMARIOS	ANTICUERPOS SECUNDARIOS
Células proliferantes	Anti-BrdU ⁺ , hecho en rata	Alexa Fluor (488), hecho en burro, color verde
Neuroblastos	Anti-DCX, hecho en conejo	Alexa Fluor (594), hecho en burro, color rojo
Células gliales	Anti-GFAP, hecho en ratón	Alexa Fluor (405), hecho en burro, color azul

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunohistoquímica.

6.9 Grupos experimentales

- Grupo 1: Se lesionó la corteza cerebral primaria de 10 ratones adultos, se administró el fármaco EOF2 de forma intranasal y se analizaron mediante inmunohistoquímica 14 días después de la lesión.
- Grupo 2: Se lesionó la corteza cerebral primaria de 10 ratones adultos, se administró el únicamente vehículo (control) y se analizaron mediante inmunohistoquímica después de la lesión.

Estos grupos experimentales recibieron inyecciones intraperitoneales de BrdU⁺ como se indicó en el apartado correspondiente.

6.10 Análisis de los resultados

Se utilizaron 10 ratones por cada grupo experimental para el análisis de las regiones en estudio. Para cuantificar las células en el contorno de la lesión se escogieron de 3 a 5 cortes histológicos por animal que incluyera la lesión. Se tuvo en cuenta como área lesionada aquella que se extendiera 200 μ m desde el borde de la lesión hacia el interior del tejido. Se consideraron la altura del corte y el área de estudio para adquirir los valores de densidad celular. En el caso de la SVZ y el DG se seleccionaron al menos 10 cortes

representativos sobre el eje anteroposterior los cuales fueron analizados en toda su extensión.

6.11 Variables

Para el estudio inmunocitoquímico de los marcadores de diferenciación en los NPC encontramos las siguientes variables:

Variable independiente

como variable categórica que indica los diferentes tipos de intervenciones. En nuestro estudio tenemos dos variables independientes:

- Presencia o ausencia del compuesto EOF2,
- y sus respectivos controles administrados únicamente con vehículo.

Variables dependientes

Es una variable cuantitativa que corresponde al número de células vivas que expresan los diferentes marcadores. Hemos analizado tres variables dependientes para cada variable independiente:

- Porcentaje de células vivas que expresan el marcador de proliferación BrdU en cada condición experimental.
- Porcentaje de células que expresan el marcador de neuroblastos DCX en cada condición experimental.
- Porcentaje de células que expresan el marcador de células gliales GFAP en cada condición experimental.
- Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos DCX.
- Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador de células gliales GFAP.

Estas variables se aplicarán tanto en el contorno de la lesión, en la SVZ y en el DG.

6.12 Análisis de datos

Los datos se recogieron en tabas de Excel. Para los análisis de los datos utilizamos el programa IBM SPSS STATISTICS 22.

Obtenida la cuantificación de las distintas variables se procedió al análisis estadístico de comparación de medias entre dos grupos mediante la prueba *t-Student* para determinar si las diferencias entre los controles (ausencia de tratamiento) y cada uno de los tratamientos eran estadísticamente significativos. En el caso de analizar más de un grupo se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de un factor y post-hoc Bonferroni.

Para los contrastes de hipótesis utilizamos siempre el nivel de significación $p < 0,05$.

Para evitar subjetividad al ejecutar las mediciones, los resultados los analizamos a ciegas, sin saber la condición a la que pertenecían hasta el final.

6.13 Dificultades y limitaciones del estudio

Se considera una limitación del estudio la extrapolación a humanos, ya que estamos realizando modelos experimentales en animales.

Una de las limitaciones del estudio es el escaso número de animales que se desea emplear. Este número está calculado basándose en trabajos anteriores en los cuales se ha llevado a cabo análisis similares y está aprobado por el Comité Ético de experimentación animal. La poca variabilidad entre este tipo de muestras facilita conseguir normalidad con un pequeño número de animales. Sin embargo, somos conscientes que es una de las limitaciones de este tipo de estudios y trabajamos con el objetivo de cumplir con las “3 erres” de la experimentación animal [71]:

- Reducir el número de animales.
- Reemplazar métodos que supongan el uso de animales por otros sin animales siempre que el resultado sea el mismo.
- Refinar los métodos para aliviar y evitar el sufrimiento de los animales de experimentación.

Sin embargo, hay varios artículos que establecen el número mínimo de animales necesarios para que el tamaño muestral sea representativo [72, 73].

7. RESULTADOS

7.1 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la migración de las células progenitoras neurales hacia la zona lesionada

Con el fin de estudiar el proceso migratorio en la regeneración de lesiones de la corteza motora de ratones adultos y la influencia de EOF2, se procedió a administrar BrdU 6 días antes de realizar la lesión en la corteza (específicamente los días 6, 5 y 4 anteriores a la realización de la lesión (Figura 7 A). De este modo se marcaron todas aquellas células que proliferaban en los nichos fisiológicamente neurogénicos y no aquellas células que se dividen en respuesta a la lesión “in situ”. Los siguientes 3 días corresponden a días en los que no se ha realizado acción alguna con el fin de eliminar del torrente sanguíneo los restos de BrdU no incorporados a las células.

Se realizó la lesión en la M1 de la corteza, como se indica en el apartado material y métodos, y durante los 14 días posteriores se administró el compuesto EOF2 de manera intranasal. Observamos que sólo los animales tratados con EOF2 presentaban células positivas para BrdU en la zona lesionada indicando que estas migraron desde regiones neurogénicas hacia la lesión, en un intento de regenerar o compensar la pérdida celular. Esta presencia de células proliferantes no se observó en aquellos animales tratados únicamente con vehículo (Figura 7 A-C).

7.2 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la generación de neuroblastos en la región lesionada

Nos preguntamos cuál sería el efecto del compuesto EOF2 en la generación de neuroblastos por lo cual en los mismos animales estudiamos la presencia del marcador de neuroblastos DCX. Sólo aquellos animales tratados con EOF2 presentaron neuroblastos en el contorno de la lesión comparados con los animales tratados únicamente con vehículo y estas diferencias eran estadísticamente significativas (Figura 7 A-B, D). Además, se observaron neuroblastos proliferantes en el contorno de la lesión marcados con BrdU y DCX simultáneamente en los animales tratados con EOF2 (Figura 7 A-B, E), estas diferencias también eran estadísticamente significativas. Esto sugiere que los neuroblastos

encontrados provenían de los nichos neurogénicos, probablemente por proximidad, de la SVZ.

7.3 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la generación de NSC sin afectar el tamaño de la cicatriz glial

Para estudiar la presencia de células gliales en el contorno de la lesión tras la administración del compuesto EOF2 se realizó una inmunohistoquímica para detectar la proteína fibrilar ácida GFAP. De esta manera quedaría en manifiesto la cicatriz glial característica tras la aparición de lesiones. Al analizar el tamaño de esta cicatriz glial ocupada por células GFAP+ con respecto al tamaño de la lesión, se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los animales control y los administrados con EOF2 (Figura 7 A-B, F). Sin embargo, encontramos células que co-expresaban GFAP y BrdU al mismo tiempo. Considerando que las NSC expresan GFAP nuestros resultados sugieren que muchas de las células que llegan a la lesión expresan marcadores de NSC que tendrán diferente destino dependiendo del nicho que se manifieste en el contorno de la lesión y que podrá ser modificado también por la presencia del compuesto EOF2 (Figura 7 A-B, G).

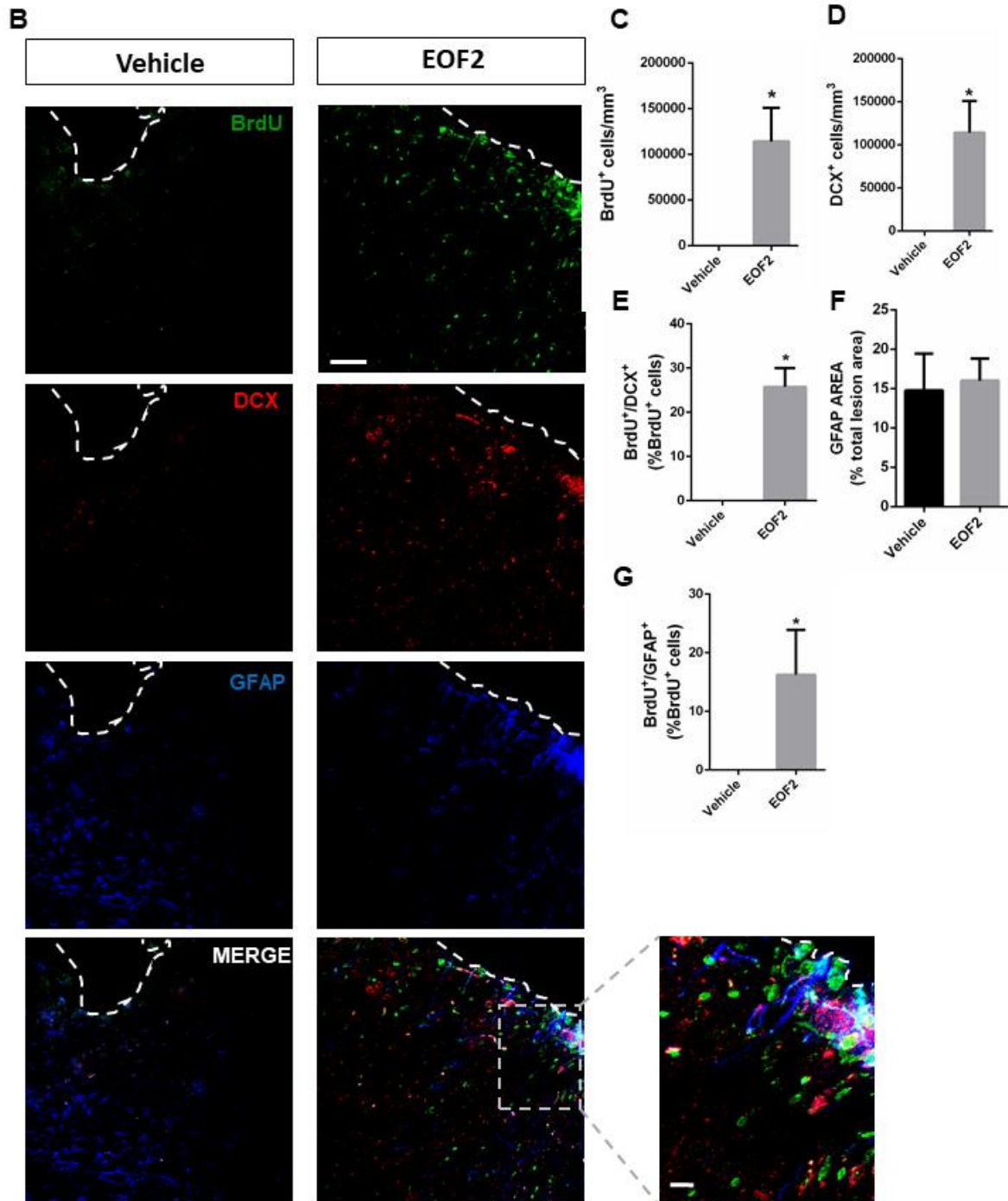


Figura 7. Efecto de la administración intranasal del compuesto EOF2 en la zona de la lesión en la proliferación y diferenciación de los NPC a neuronas o células gliales. (A) Cronograma del experimento, tiempo de administración y marcas. (B) Fotomicrografías de microscopia confocal de una lesión cortical de cerebro de ratón adulto tras la administración intranasal durante 14 días del compuesto EOF2 (5 μ M) o únicamente vehículo, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de células gliales GFAP, del marcador de neuroblastos DCX y del marcador de proliferación BrdU. El análogo de timidina BrdU se administró intraperitonealmente 6-3 días anteriores a la realización de la lesión dejando 3 días más para el lavado de los restos que no se incorporaron en aquellas células proliferantes. (C) El gráfico representa el número de células BrdU⁺ por mm³ tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste. (D) El gráfico representa el número de células que expresan el marcador DCX (neuroblastos) por mm³ tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste. (E) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador DCX (neuroblastos) respecto a las células que expresan BrdU⁺. (F) El gráfico representa el porcentaje de células GFAP (células gliales o NSC) tras la administración del compuesto EOF2 o la ausencia de éste, respecto a las células que expresan BrdU (G) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador GFAP (células gliales y NSC) respecto a las células que expresan BrdU⁺. Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 10 animales por condición. Estadística: * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en t-Student.

7.4 La administración intranasal del compuesto EOF2 induce la migración de las células progenitoras neurales desde la SVZ a la lesión

Seguidamente, analizamos la neurogénesis en la SVZ. Observamos que el área ocupada por células que expresan el marcador de neuroblastos DCX con respecto al área total de SVZ no se ve afectada por el tratamiento (Figura 8 A-B). Estas mismas características se observan para el área ocupada por el marcador de células gliales GFAP (Figura 8 A, C). Además, observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la zona de la SVZ que se corresponde a la zona lesionada (ipsilateral) en comparación con la zona no lesionada (contralateral) independientemente de la presencia o no de tratamiento, donde la zona contralateral presenta más células proliferantes (BrdU⁺), indicando que las células de la SVZ correspondiente a zona lesionada, podrían estar migrando hacia la lesión. Al estudiar el efecto del EOF2 observamos que las células tienden a migrar más, siendo el número de éstas menor al comparar las zonas ipsilaterales de los ratones tratados con EOF2 o únicamente con vehículo. Estos hallazgos indican que el compuesto EOF2 podría estar induciendo la migración de los NPC hacia la lesión, en un intento de regenerarla (Figura 8. A-E). Lo mismo sucede al observar las células que expresan BrdU y DCX a la vez, donde en el lado ipsilateral tratado con EOF2 las células que expresan ambos marcadores son menores en proporción y esta diferencia es estadísticamente significativa. No sucede lo mismo con las células que expresan el marcador de células gliales GFAP y el marcador de proliferación BrdU (Figura 8 A, D-F).

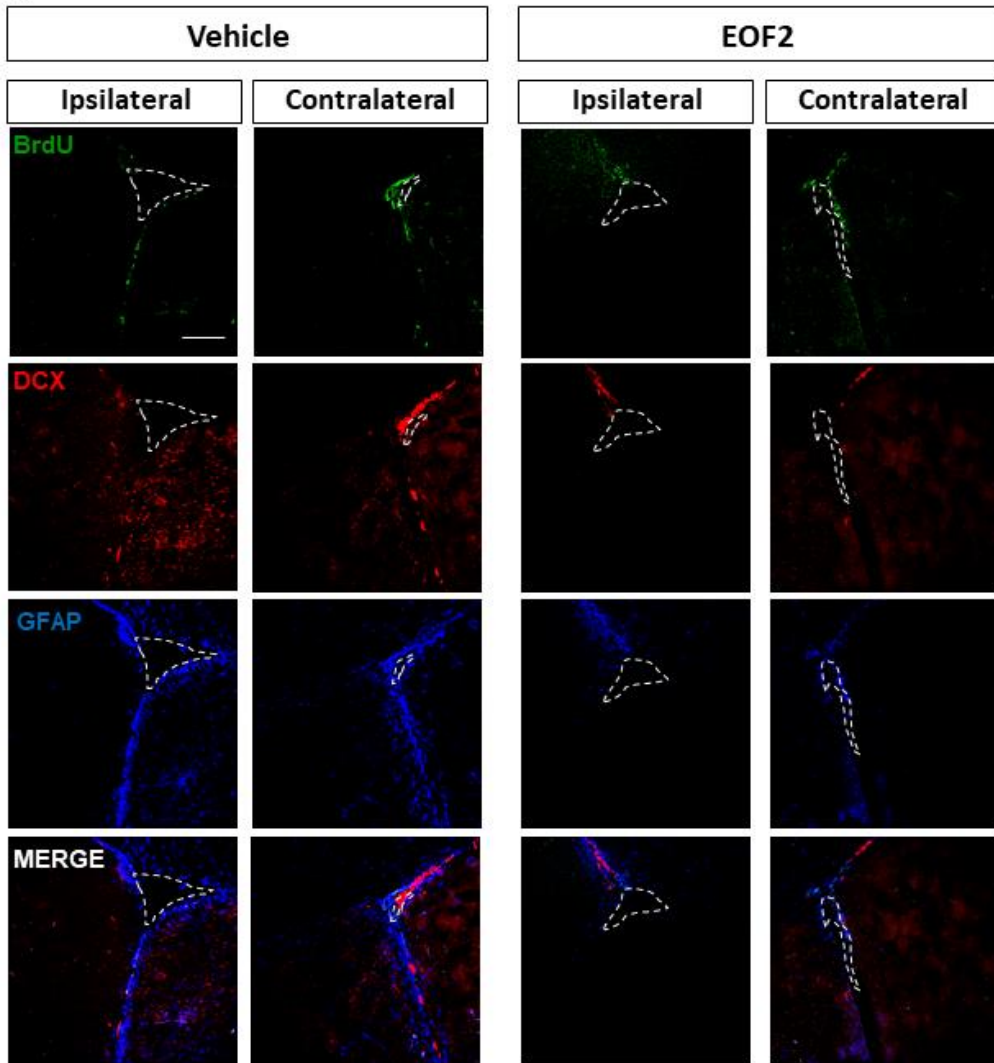
7.5 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la generación de neuroblastos en la SVZ

Posteriormente, analizamos la presencia del marcador de neuroblastos DCX. En primer lugar, el análisis reveló que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo de animales a los que se le había administrado el compuesto EOF2 de forma intranasal en el porcentaje de células que expresan el marcador DCX, ni en el área ipsilateral ni en el área contralateral a la lesión (Figura 8 A-B). Sin embargo, se advierte que existe un menor porcentaje estadísticamente significativo de células que co-expresan los marcadores BrdU y DCX en la zona ipsilateral en el grupo al que se le administró el EOF2, este resultado no se observa en la zona contralateral (Figura 8 F). Este menor porcentaje de células en la SVZ puede ser explicado, como se mencionó anteriormente, a la migración de éstas, desde este nicho neurogénico hacia la lesión, con el fin de compensar la pérdida celular.

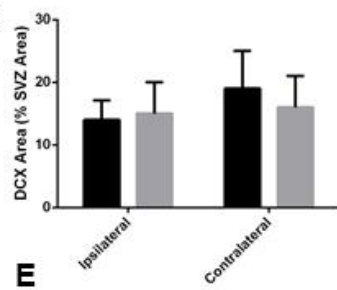
7.6 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la diferenciación de los NPC hacia la estirpe glial en la SVZ

Para analizar si la administración del EOF2 promueve la diferenciación de los NPC a células gliales se realizó una inmunohistoquímica para detectar el marcador de células gliales: GFAP. En el análisis no observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo al que se le aplicó nuestro compuesto, ni en la zona ipsilateral ni contralateral a la lesión, en el porcentaje de células que expresan el marcador de células gliales GFAP, ni en el porcentaje de células que co-expresan los marcadores BrdU y GFAP (Figura 8 A, C-D).

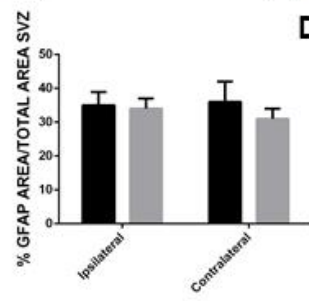
A



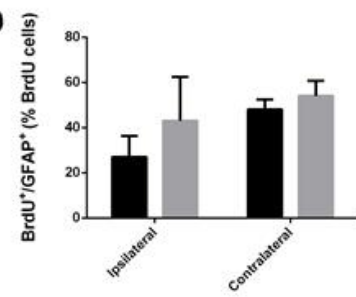
B



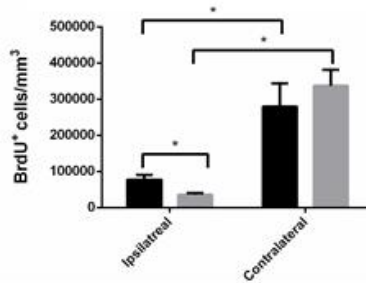
C



D



E



F

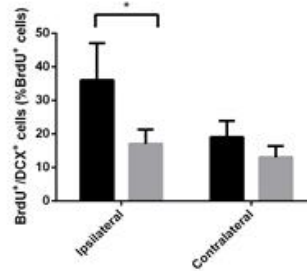


Figura 8. Efecto de la administración intranasal del compuesto EOF2 en la SVZ en la proliferación y diferenciación de los NPC a neuronas o células gliales. (A) Fotomicrografías de microscopia confocal de una lesión cortical de cerebro de ratón adulto tras la administración intranasal durante 14 días del compuesto EOF2 (5 μ M) o únicamente vehículo, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de células gliales GFAP, del marcador de neuroblastos DCX y del marcador de proliferación BrdU. El análogo de timidina BrdU se administró intraperitonealmente 6-3 días anteriores a la realización de la lesión dejando 3 días más para el lavado de los restos que no se incorporaron en aquellas células proliferantes. (B) El gráfico representa el porcentaje de células que expresan el marcador DCX (neuroblastos) por mm^3 tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste, tanto para las áreas ipsilaterales como contralaterales de la lesión. (C) El gráfico representa el porcentaje de células GFAP⁺ (células gliales o NSC) tras la administración del compuesto EOF2 o la ausencia de éste en ambos hemisferios. (D) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador GFAP (células gliales) respecto al total de células vivas. (E) El gráfico representa el número de células BrdU⁺ por mm^3 tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste, tanto en la zona ipsilateral como contralateral. (G) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador DCX (neuroblastos) respecto a las células que expresan BrdU. Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 10 animales por condición. Estadística: * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en t-Student.

7.7 La administración intranasal del compuesto EOF2 no induce la proliferación de los NPC en el DG

Se estudió el efecto de la administración intranasal de EOF2 o únicamente vehículo, sobre la proliferación (células marcadas con BrdU) de los NPC en el DG después de la realización de una lesión mecánica en la corteza de los ratones adultos. El patrón de inyección de BrdU se corresponde al indicado anteriormente. En este caso no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa en el número de células BrdU⁺ por milímetro cúbico, entre el grupo control y grupo en tratamiento, ni en la zona ipsilateral ni en la zona contralateral (Figura 9 A-B).

7.8 La administración intranasal del compuesto EOF2 reduce la presencia de neuroblastos en el DG

Tras realizar el estudio, se logró evidenciar que existe un menor número de células marcadas con DCX en los animales tratados con EOF2 frente al vehículo, tanto en la zona contralateral como en la zona ipsilateral a la lesión, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 9 A, C). Este resultado sugiere que la migración de NPC que pueden generar neuroblastos hacia la zona de la lesión desde un nicho neurogénico (Figura 9 A, C). Por otro lado, al analizar la co-expresión de BrdU y DCX no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ninguno de los hemisferios (Figura 9 A, E).

7.9 La administración intranasal del compuesto EOF2 disminuye las células gliales en el DG

Al revisar los resultados se distingue una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y EOF2, siendo menor el porcentaje de células que expresan GFAP, tanto en la zona ipsilateral como contralateral, en el grupo al que le aplicamos nuestro compuesto (Figura 9 A, D). Estas mismas diferencias no se observa en las células que co-expresan BrdU y GFAP simultáneamente.

A

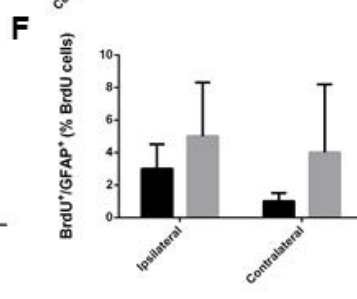
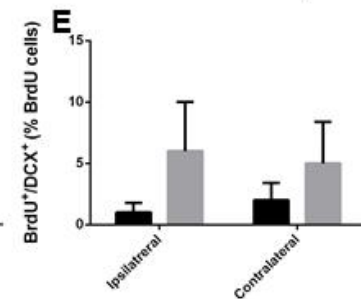
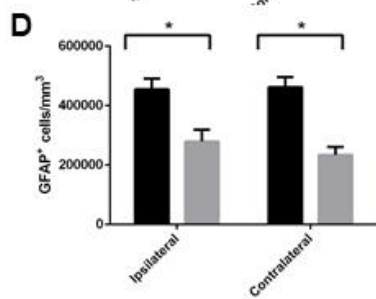
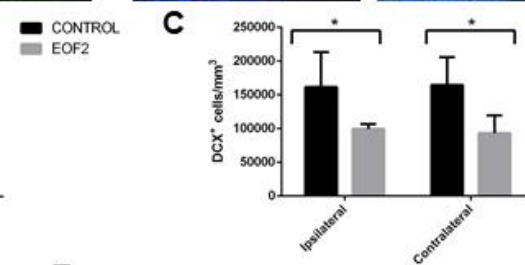
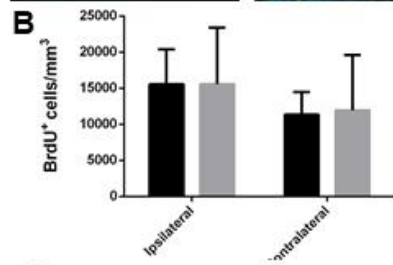
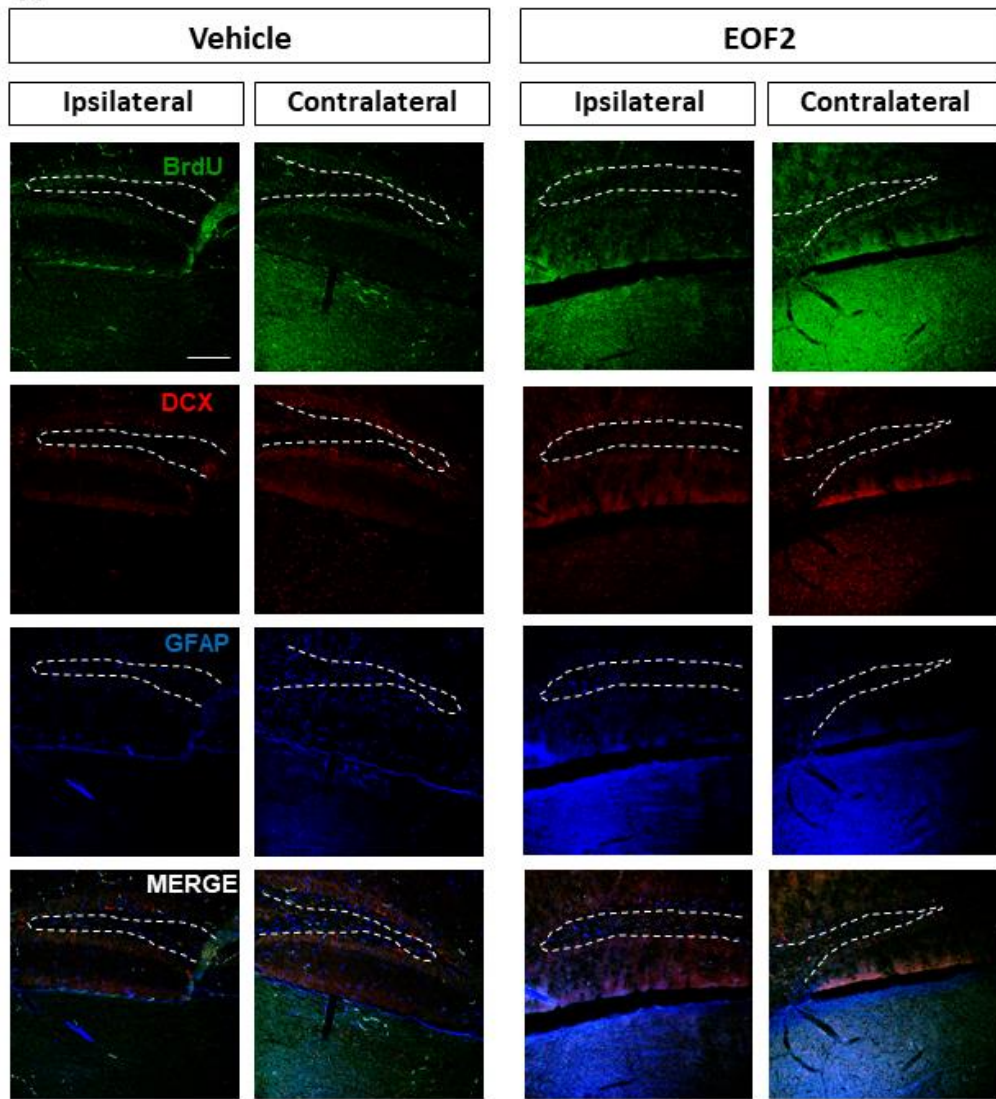


Figura 9. Efecto de la administración intranasal del compuesto EOF2 en el DG en la proliferación y diferenciación de los NPC a neuronas o células gliales. (A) Fotomicrografías de microscopia confocal de una lesión cortical de cerebro de ratón adulto tras la administración intranasal durante 14 días del compuesto EOF2 (5 μ M) o únicamente vehículo, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de células gliales GFAP, del marcador de neuroblastos DCX y del marcador de proliferación BrdU. El análogo de timidina BrdU se administró intraperitonealmente 6-3 días anteriores a la realización de la lesión dejando 3 días más para el lavado de los restos que no se incorporaron en aquellas células proliferantes. (B) El gráfico representa el número de células BrdU⁺ por mm³, presentes en el DG tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste, tanto para las áreas ipsilaterales como contralaterales de la lesión. (C) El gráfico representa el número de células que expresan el marcador DCX (neuroblastos) por mm³ tras el tratamiento con el compuesto EOF2 o la ausencia de éste, tanto para las áreas ipsilaterales como contralaterales de la lesión. (D) El gráfico representa el porcentaje de células GFAP (células gliales o NSC) tras la administración del compuesto EOF2 o la ausencia de éste, respecto a las células que expresan BrdU (E) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador DCX (neuroblastos) respecto a las células que expresan BrdU. (F) Porcentaje de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador GFAP (células gliales) respecto al total de células que expresan BrdU. Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 10 animales por condición. Estadística: * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en t-Student.

8. DISCUSIÓN

Muchas enfermedades del SNC, cursan con una pérdida neuronal, y ninguna de estas alteraciones tiene tratamiento eficaz actualmente. La mayoría de las estrategias para encontrar opciones terapéuticas coinciden en tratar de estimular o favorecer la neurogénesis en la región dañada. En el cerebro adulto existen dos regiones neurogénicas por excelencia: la SVZ y el DG; sin embargo, existen datos que demuestran que hay una respuesta neurogénica a la lesión, aunque en la mayoría de las lesiones, la capacidad de reponer neuronas es muy limitada y se hace preciso conocer los agentes que participan en esta respuesta neurogénica para poder utilizarlos como dianas terapéuticas. Uno de los problemas que plantea la terapia celular en las enfermedades del SNC es que las NSC trasplantadas se diferencian a glía y no a neuronas. Este hecho se puede explicar en función del nicho o microambiente en el que se trasplantan las células. El conjunto de interacciones de citoquinas y de contactos celulares existente en una región neurogénica que permite la diferenciación neuronal, como la SVZ, difiere notablemente de las condiciones generadas como consecuencia de una lesión tisular (expresión de nuevos factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, etc.) que favorecen la diferenciación glial y/o impiden la neuronal.

Para que exista neurogénesis es preciso que las NSC que permanecen quiescentes en los tejidos lleven a cabo una división asimétrica produciendo NPC indiferenciados con alta capacidad proliferativa. Además, es preciso que éstos proliferen y que sean capaces de diferenciarse a neuronas y no a células de glía.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado cómo la activación de PKC mediante el activador PMA es capaz de promover la proliferación de NPC *in vitro*. Sin embargo, el PMA, debido a su capacidad de activar la mayoría de las PKC, es un agente tumorigénico en células de neuroblastoma y que por tanto difícilmente podría usarse en la clínica, o *in vitro* para cultivar NPC con fines terapéuticos [56].

Existen varias enzimas en la familia de PKC, el efecto de cada una es diferente y depende del tipo de PKC activada y del contexto en que se encuentre esta quinasa, del tipo celular y de la duración de la activación. Existen PKC capaces de promover tanto la progresión del ciclo celular como su parada. Esto depende del tipo celular, del tipo de PKC, de los elementos posteriores en la cascada de señalización, y de la duración de la señal (Revisado en [45]). Así, diversas PKC promueven la proliferación en diferentes tipos celulares y otras isoformas de PKC inhiben la proliferación. Como el PMA es un éster de forbol activador inespecífico de PKC, promueve la proliferación de muchos tipos celulares incluidos un gran número de células tumorales.

Resultados previos indican que la activación de una isoforma de PKC que ha sido implicada en la progresión del ciclo celular en NPC: la PKC ϵ , promueve la diferenciación glial y la proliferación en NPC aislados de ratas posnatales [54].

En estudios anteriores en nuestro laboratorio se analizó el efecto el diterpeno con estructura de latirano, EOF2, aislado por nuestro grupo de investigación a partir de plantas del género *Euphorbia*, demostrándose que es capaz de promover la diferenciación de los NPC a neuronas y que este efecto es debido a su capacidad de activar PKC θ . Se demostró que en presencia de este activador de PKC, los NPC cultivados *in vitro* se diferencian fundamentalmente a neuroblastos y a neuronas, sin tener ningún efecto en la proliferación de los NPC, sugiriendo que es capaz de activar una isoenzima de PKC que no está comprometida en la proliferación, sino en la diferenciación.

Con el fin de probar este compuesto en el proceso de diferenciación y migración de los NPC hacia neuroblastos o neuronas, lo administramos de manera intranasal en ratones adultos, lesionados previamente en su corteza motora primaria. Para ello administramos BrdU 6 días antes de realizar la lesión en la corteza. Así se marcaron todas aquellas células que proliferaban en los nichos fisiológicamente neurogénicos y no aquellas células que se dividen en respuesta a la lesión "*in situ*"; posteriormente se realizó una lesión en la M1 de la corteza, para durante los 14 días posteriores administrarse el compuesto EOF2. Un protocolo similar de inyección de BrdU fue utilizado anteriormente para otros estudios de migración [44]. Los resultados obtenidos dejaban en evidencia que sólo los animales tratados con EOF2 presentaban células positivas para BrdU⁺ en la zona lesionada, por tanto, la administración intranasal de este compuesto induce la migración de los NPC hacia la zona lesionada desde regiones neurogénicas, en un intento por regenerar o compensar la pérdida celular (Figura 7 A-C).

Por otro lado, solamente los animales a los que se le había aplicado el compuesto EOF2 presentaron neuroblastos en el contorno de la lesión en contraste con aquellos tratados únicamente con vehículo, así como neuroblastos proliferantes marcados con BrdU y DCX simultáneamente, por ende, la administración intranasal del compuesto EOF2 induce la generación de neuroblastos en la zona lesionada.

A continuación, nos interesaba conocer los efectos del EOF2 en la SVZ. Detectamos que la zona de la SVZ correspondiente a la zona lesionada (ipsilateral) presenta menos células proliferantes, diferencia que se acentúa más al aplicar el compuesto EOF2 (Figura 8). Esto se fundamenta en que en la zona ipsilateral se distingue menos número de células BrdU⁺ en los individuos que fueron tratados con EOF2. Además, al estudiar la presencia del marcador de neuroblastos DCX, no se distingue diferencia entre ambos grupos, aunque el número de células que co-expresan los marcadores BrdU⁺ y DCX en la zona ipsilateral a la lesión es menor en el grupo al que se le administró EOF2 (Figura 8). Este menor porcentaje de células en la SVZ puede ser explicado por la migración de éstas, desde este nicho neurogénico hacia la lesión. Así mismo, en la SVZ, al estudiar el número de células gliales mediante el marcador GFAP, observamos que la administración intranasal del compuesto

EOF2 no induce la diferenciación de los NPC hacia la estirpe glial, ya que no se evidenció diferencias entre el grupo control y el grupo tratado con el EOF2 en dicho marcador.

Finalmente, nuestro trabajo se centró en el efecto de la administración intranasal del EOF2 a nivel del DG. Los resultados que hemos obtenido demuestran que el EOF2 no induce la proliferación de los NPC en el DG, ya que no se aprecia una diferencia en el número de células BrdU⁺ entre el grupo control y el grupo en tratamiento. Por otro lado, al estudiar el número de células marcadas con DCX es menor en los animales tratados con EOF2, frente al vehículo, tanto en la zona contralateral como ipsilateral a la lesión. Este dato corrobora el comportamiento migratorio de los NPC desde este nicho neurogénico a la lesión. Finalmente, al estudiar el efecto del EOF2 sobre las células gliales en el DG, se aprecia que el compuesto EOF2 disminuye las células gliales en este nicho neurogénico, ya que el porcentaje de células que expresa GFAP es menor tanto en la zona ipsilateral, como contralateral, en el grupo en el que administramos el compuesto. Esta es la primera vez que se demuestra que el EOF2, no solo favorece la diferenciación de los NPC a neuronas, sino que además induce la migración de estos hacia la zona de la lesión.

En síntesis y como conclusión general, podemos decir que los resultados obtenidos demuestran que nuestro diterpeno EOF2, es un compuesto clave a la hora de diseñar fármacos que favorezcan la formación de neuronas en el cerebro adulto, induciendo los NPC a la migración desde los nichos neurogénicos hasta la zona de la lesión. De este modo, la síntesis de moléculas farmacológicas basadas en este compuesto podría favorecer la regeneración de lesiones cerebrales, aunque es preciso realizar más estudios para demostrar el papel de este en la capacidad de activar efectivamente PKC θ , sugiriendo que es capaz de activar una isoenzima de PKC que no está comprometida en la proliferación de los NPC, sino en la diferenciación de estos y en la migración.

9. CONCLUSIONES

1. La administración intranasal del compuesto EOF2 favorece la migración de los NPC desde nichos neurogénicos hacia la zona lesionada del cerebro de un ratón adulto y la supervivencia de estas.

2. La administración intranasal de EOF2 no afecta el tamaño de la cicatriz glial en esta, característica tras la aparición de estas lesiones.

3. En la SVZ ipsilateral a la lesión hay una menor presencia de células marcadas con BrdU en contraste al hemisferio contralateral a la lesión, indicando que estas células están migrando por proximidad a la zona lesionada para regenerar el tejido dañado.

4. En la SVZ el compuesto EOF2 no tiene efectos sobre la generación de neuroblastos o la diferenciación de los NPC hacia la estirpe glial.

5. No tiene efecto sobre la proliferación de NPC en el DG, sin embargo, parece favorecer la migración de los NPC hacia la zona lesionada.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
2. Paton, J.A., B.E. O'Loughlin, and F. Nottebohm, *Cells born in adult canary forebrain are local interneurons*. J Neurosci, 1985. **5**(11): p. 3088-93.
3. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
4. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
5. Richards, L.J., T.J. Kilpatrick, and P.F. Bartlett, *De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8591-5.
6. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
7. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
8. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.

9. Surani, M.A., K. Hayashi, and P. Hajkova, *Genetic and epigenetic regulators of pluripotency*. Cell, 2007. **128**(4): p. 747-62.
10. Firestone, A.J. and J.K. Chen, *Controlling destiny through chemistry: small-molecule regulators of cell fate*. ACS Chem Biol, 2010. **5**(1): p. 15-34.
11. Weissman, I.L., *Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1442-6.
12. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
13. Emsley, J.G., et al., *Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells*. Prog Neurobiol, 2005. **75**(5): p. 321-41.
14. Gage, F.H., et al., *Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11879-83.
15. Lyssiotis, C.A., et al., *Chemical control of stem cell fate and developmental potential*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(1): p. 200-42.
16. Yao, B. and P. Jin, *Unlocking epigenetic codes in neurogenesis*. Genes Dev, 2014. **28**(12): p. 1253-71.
17. Alvarez-Buylla, A. and J.M. Garcia-Verdugo, *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 629-34.
18. Abrus, D.N., M. Koehl, and M. Le Moal, *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 523-69.
19. Ryu, J.R., et al., *Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain*. Mol Brain, 2016. **9**: p. 43.
20. Menn, B., et al., *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain*. J Neurosci, 2006. **26**(30): p. 7907-18.
21. Lim, D.A. and A. Alvarez-Buylla, *Adult neural stem cells stake their ground*. Trends Neurosci, 2014. **37**(10): p. 563-71.
22. Seri, B., et al., *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus*. J Neurosci, 2001. **21**(18): p. 7153-60.
23. Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. J Neurosci, 1997. **17**(13): p. 5046-61.
24. Suh, H., et al., *In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 515-28.
25. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
26. Gross, R.E., et al., *Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells*. Neuron, 1996. **17**(4): p. 595-606.
27. Dash, P.K., S.A. Mach, and A.N. Moore, *Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury*. J Neurosci Res, 2001. **63**(4): p. 313-9.

28. Arvidsson, A., et al., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 963-70.
29. Teramoto, T., et al., *EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1125-32.
30. Seidenfaden, R., et al., *Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain*. Mol Cell Neurosci, 2006. **32**(1-2): p. 187-98.
31. Benner, E.J., et al., *Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4*. Nature, 2013. **497**(7449): p. 369-73.
32. Cao, Q.L., et al., *Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage*. Exp Neurol, 2001. **167**(1): p. 48-58.
33. Pluchino, S., et al., *Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis*. Nature, 2003. **422**(6933): p. 688-94.
34. Herrera, D.G., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain*. Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 867-77.
35. Mligiliche, N.L., et al., *Survival of neural progenitor cells from the subventricular zone of the adult rat after transplantation into the host spinal cord of the same strain of adult rat*. Anat Sci Int, 2005. **80**(4): p. 229-34.
36. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, *The glial scar and central nervous system repair*. Brain Res Bull, 1999. **49**(6): p. 377-91.
37. Bush, T.G., et al., *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 297-308.
38. Carulli, D., et al., *Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 116-20.
39. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
40. Liu, L., M. Rudin, and E.N. Kozlova, *Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat*. Exp Brain Res, 2000. **131**(1): p. 64-73.
41. Romero-Grimaldi, C., et al., *ADAM-17/tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells*. Stem Cells, 2011. **29**(10): p. 1628-39.
42. Dempsey, E.C., et al., *Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L429-38.
43. Susarla, B.T., et al., *Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice*. ASN Neuro, 2014. **6**(3): p. 159-70.
44. Geribaldi-Doldan, N., et al., *Specific inhibition of ADAM17/TACE promotes neurogenesis in the injured motor cortex*. Cell Death Dis, 2018. **9**(9): p. 862.

45. Black, A.R. and J.D. Black, *Protein kinase C signaling and cell cycle regulation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 423.
46. Gundlfinger, A., et al., *Different regulation of Purkinje cell dendritic development in cerebellar slice cultures by protein kinase Calpha and -beta*. J Neurobiol, 2003. **57**(1): p. 95-109.
47. Coronado-Parra, T. and S. Corbaí An-García, *SEÑALIZACIÓN CELULAR: PKC Y CÁNCER*. 2013.
48. Nishizuka, Y., *The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 661-5.
49. Nishizuka, Y., *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses*. FASEB J, 1995. **9**(7): p. 484-96.
50. Newton, A.C., *Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1993. **22**: p. 1-25.
51. Corbit, K.C., et al., *Different protein kinase C isoforms determine growth factor specificity in neuronal cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5392-403.
52. Matsushima, H., et al., *Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent protein kinase C changes in the brain of patients with Alzheimer's disease*. J Neurochem, 1996. **67**(1): p. 317-23.
53. Garcia-Bernal, F., et al., *Protein Kinase C Inhibition Mediates Neuroblast Enrichment in Mechanical Brain Injuries*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 462.
54. Steinhart, R., et al., *PKCepsilon induces astrocytic differentiation of multipotential neural precursor cells*. Glia, 2007. **55**(2): p. 224-32.
55. Wang, J., et al., *Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(1): p. 23-35.
56. Geribaldi-Doldan, N., et al., *12-Deoxyphorbols Promote Adult Neurogenesis by Inducing Neural Progenitor Cell Proliferation via PKC Activation*. Int J Neuropsychopharmacol, 2015. **19**(1).
57. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332** (Pt 2): p. 281-92.
58. Raballo, R., et al., *Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex*. J Neurosci, 2000. **20**(13): p. 5012-23.
59. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.
60. Annenkov, A., *Receptor tyrosine kinase (RTK) signalling in the control of neural stem and progenitor cell (NSPC) development*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(1): p. 440-71.
61. Sanchez-Duffhues, G., et al., *Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists. A novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs*. Curr Drug Targets, 2011. **12**(3): p. 348-56.

62. Castagna, M., et al., *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
63. Ashendel, C.L., *The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase*. Biochim Biophys Acta, 1985. **822**(2): p. 219-42.
64. Blumberg, P.M., *Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture*. Cancer Res, 1988. **48**(1): p. 1-8.
65. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(1): p. 13-25.
66. Keaney, J. and M. Campbell, *The dynamic blood-brain barrier*. FEBS J, 2015. **282**(21): p. 4067-79.
67. Dhuria, S.V., L.R. Hanson, and W.H. Frey, 2nd, *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations*. J Pharm Sci, 2010. **99**(4): p. 1654-73.
68. Chapman, C.D., et al., *Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans*. Pharm Res, 2013. **30**(10): p. 2475-84.
69. Thorne, R.G., et al., *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration*. Neuroscience, 2004. **127**(2): p. 481-96.
70. Marks, D.R., et al., *Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors*. J Neurosci, 2009. **29**(20): p. 6734-51.
71. McGrath, J.C., E.M. McLachlan, and R. Zeller, *Transparency in Research involving Animals: The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(10): p. 2427-32.
72. Curtis, M.J., et al., *Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(14): p. 3461-71.
73. McGrath, J.C., et al., *Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1573-6.